

ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

SUR L'INOCULATION INTRACÉRÉBRALE (*) DE BACILLES TUBERCULEUX ET PARA-TUBERCULEUX CHEZ LES SINGES INFÉRIEURS

par IVAN BERTRAND et JEAN BABLET.

Dans un mémoire précédent (1), sur « *L'inoculation intracérébrale expérimentale envisagée comme moyen d'identification des différents types de bacilles de Koch* », nous avons été amenés à conclure que le procédé d'inoculation intracérébrale mis en œuvre chez le lapin suivant la technique indiquée permettait de différencier les souches tuberculeuses d'une façon plus rapide et plus rigoureuse que l'injection intraveineuse à faible dose utilisée couramment chez le même animal.

Cette observation, toutefois, ne constituait pas le but initial de nos essais expérimentaux. Nous nous proposons en effet de rechercher la reproduction chez le lapin du tuberculome cérébral que l'on observe dans les salles d'opération ou d'autopsie des hôpitaux, le plus souvent par hasard et sans que le diagnostic clinique de cette affection ait été posé.

Or, les souches de bacilles de Koch de types divers et de virulence variable que nous avons introduites dans le cerveau

(*) Mémoire remis à la rédaction en décembre 1940.

(1) Ces Annales, 59, 1937, p. 231.

du lapin se sont révélées impuissantes à reproduire l'évolution et l'aspect anatomique si particuliers du tubercule solitaire cérébral.

Nous avons pensé que le singe conviendrait mieux que le lapin au but poursuivi. Ayant pu disposer d'un certain nombre de singes cynocéphales africains, nous nous sommes adressés à cet animal pour la réalisation de notre programme expérimental.

Nous n'avons pas trouvé dans la littérature de relations d'essais analogues, mais, comme beaucoup de travaux étrangers récents ont pu nous échapper en raison des circonstances, nous prions les auteurs qui auraient déjà publié des mémoires sur cette question de vouloir bien nous excuser de ne pas les avoir cités avant de rapporter les résultats de nos propres expériences.

I. — Partie expérimentale.

Dix jeunes cynocéphales (*Papio papio*) et un callitriche (*Cercopithecus aethiops sabaeus*) provenant d'un même envoi de l'Institut Pasteur de Kindia (Guinée) ont été choisis avec soin pour cette série d'expériences, un mois environ après leur arrivée à la singerie. Ils étaient sensiblement de même âge et de même poids. Ils s'étaient acclimatés rapidement et habitués à leur nouveau régime. Leur état général était excellent. Ils ont été isolés des autres singes neufs et gardés en observation jusqu'au moment de l'inoculation (2).

Technique de l'inoculation. — La peau du crâne, épilée et badigeonnée de teinture d'iode, est incisée au bistouri à 3 centimètres de la ligne bipariétale et à mi-chemin des sutures fronto- et occipito-pariétales. La dure-mère, mise à nu au trépan, est traversée par une aiguille fine de 1 cent. 5 de longueur qui introduit en plein hémisphère cérébral 1/20 de milligramme (poids sec) de bacilles émulsionnés dans 1/20 de centimètre cube d'eau physiologique. Ces bacilles provenaient de cultures de trois à quatre semaines.

Après suture de la peau, l'animal est isolé dans une cage et gardé en observation jusqu'à sa mort ou sacrifié au bout de six à huit mois.

(2) Un cynocéphale inoculé avec une souche bovine V. B. a dû être éliminé ayant succombé, dix-neuf jours après l'inoculation, d'une maladie parasitaire chronique, contractée en A. O. F. (ankylostomiase).

Les nécropsies ont toujours été faites immédiatement après la mort. Le cerveau prélevé en entier a été plongé dans du formol de Merck à 20 p. 100, renouvelé au bout de vingt-quatre heures puis à la fin de la première semaine. Il n'était examiné qu'après quinze jours de fixation. Les deux hémisphères étaient alors séparés et des coupes frontales pratiquées pour l'étude topographique des lésions. Les fragments choisis

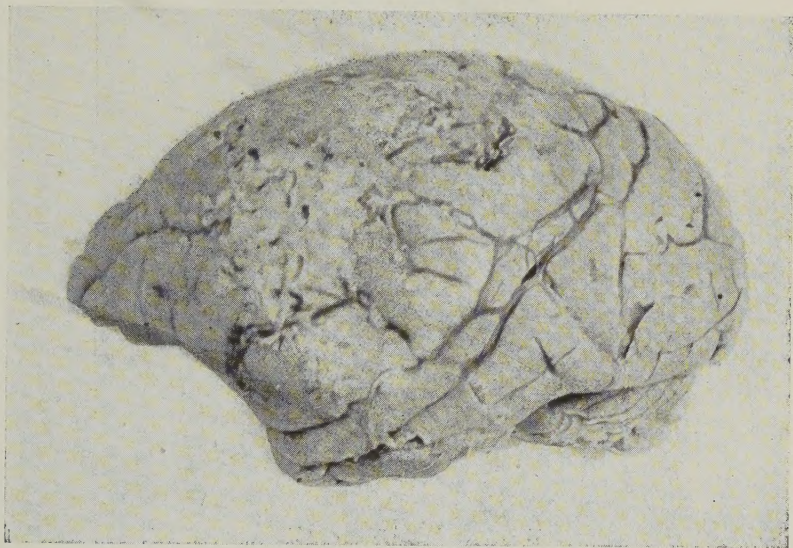


FIG. 1. — Cerveau de cynocéphale inoculé avec une souche de tuberculose de type humain (souche Sohler, exp. 1) : large placard réactionnel autour du point d'inoculation. Grandeur nature.

pour l'examen microscopique étaient inclus à la paraffine et à la celloïdine. Les premiers étaient colorés à l'hémalum-éosine, à l'hématoxyline de Mallory et au Ziehl-picro-carmin d'indigo ; les coupes à la celloïdine étaient traitées par les méthodes de Nissl et de Loyez.

EXPÉRIENCE I. — Un cynocéphale ♂ est inoculé, dans les conditions ci-dessus indiquées, le 9 juin 1938, avec une souche de bacilles tuberculeux de type humain, récemment isolée d'un cas de méningite (souche D^r Sohler). L'animal meurt le 7 juillet (vingt-huit jours) après une courte période de prostration, sans phénomènes paralytiques.

A l'autopsie, on constate l'épaississement des méninges et l'existence

d'une large zone réactionnelle d'aspect nécrotique avec granulations blanchâtres du côté inoculé seulement. L'hémisphère opposé est en apparence indemne.

A l'examen macroscopique des coupes frontales de l'hémisphère gauche, le trajet de l'inoculation apparaît entouré par une large zone

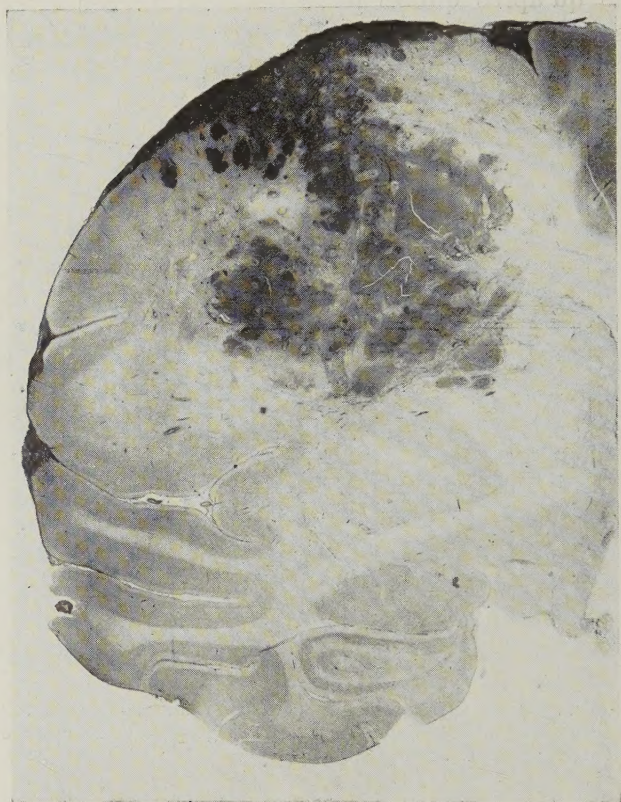


FIG. 2. — Coupe frontale de l'hémisphère gauche représenté figure 1; sous la coupole réactionnelle méningée, des nodules plus ou moins confluents atteignent à travers le centre ovale les noyaux gris centraux. L'ectasie vasculaire et l'aspect angiomateux des zones inflammatoires sont nettement visibles à ce faible grossissement (F 374). Gross. : 2,5.

de désintégration s'enfonçant en pointe dans le parenchyme nerveux et s'élargissant en coupole au niveau des méninges.

L'examen histologique (F. 374) montre de volumineuses nappes d'encéphalite tuberculeuse s'enfonçant à travers le centre ovale jusqu'aux noyaux gris centraux qui sont respectés. L'infiltration méningée s'arrête vers le haut à 1 centimètre du sinus longitudinal supérieur. La zone infiltrée mesure environ 15 millimètres d'épaisseur.

Lésions polycentriques allant jusqu'à la suppuration histologique. Dans l'intervalle des zones infiltrées, réactions d'encéphalite banale avec œdème, périvasculaires et cellules réactionnelles gliales et leucocytaires variées.

Les infiltrats les plus denses se divisent grossièrement en deux groupes :

1° Les zones suppurées où les polynucléaires sont presque confluent, séparés seulement par de petits amas nécrotiques.

2° Les infiltrats histiocytaires, dont les volumineuses cellules à

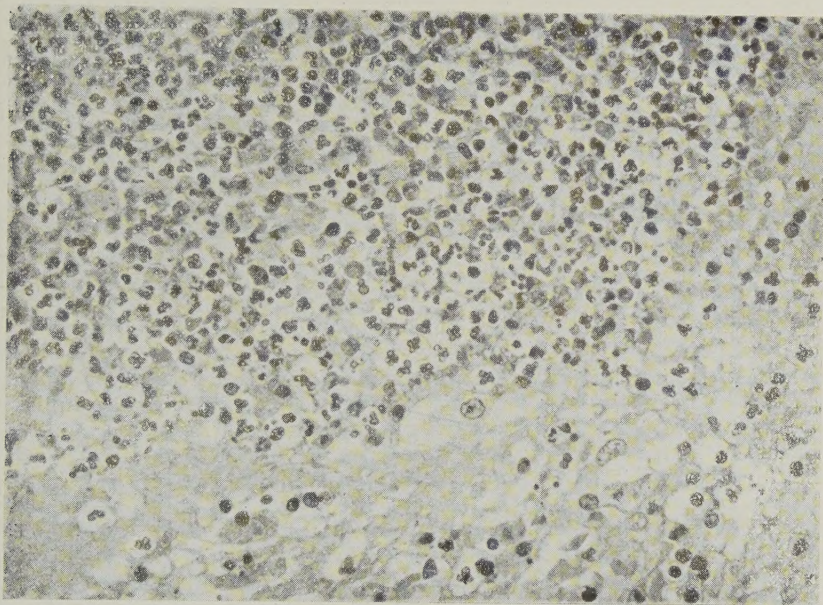


FIG. 3. — Aspect microscopique de l'abcès cérébral dont les deux figures précédentes précisent la topographie : amas de polynucléaires en voie de désintégration, rares histiocytes à la périphérie (F374). Gross. : 350.

condensation protoplasmique marginale, à petit noyau, montrent une activité phagocytaire très accusée, leur cytoplasme étant bourré de débris de polynucléaires et d'amas granulo-gras-seux. A un degré de plus, les histiocytes subissent une nécrose sur place et deviennent confluent. Mais, même dans les zones les plus nécrosées, on ne constate pas de caséification réelle. Plus rarement, aspects de nécrose fibroïde vers la région marginale des infiltrats.

Périvasculaires abondantes entre les infiltrats, formule à prédominance lymphocytaire et monocytaire, très rares plasmocytes. Pas d'organisation vers la fibrose.

Bacilles assez rares, visibles surtout dans les zones histiocytaires.

L'infection s'est propagée aux *organes* : le poumon ne présente pas

de lésions visibles à l'œil nu, mais les *ganglions* trachéo-bronchiques sont hypertrophiés et l'examen histologique révèle des plages épithélioïdes largement caséuses ; dans le poumon, on ne note qu'une infiltration diffuse irrégulière de la trame. Il existe quelques granulations sur la *rate* et sur le *foie*, ce sont des follicules épithélioïdes à centre nécrotique dans la rate et des amas réactionnels où prédominent les polynucléaires dans le foie. Dans le rein, irritation glomérulaire et vacuolisation des épithéliums tubulaires.

EXPÉRIENCE II. — Un cynocéphale ♀ est inoculé le 22 novembre 1938 avec une souche de bacilles tuberculeux très virulente isolée de crachats (souche Cr. XXIX Van Deinsen). Cette souche est du type humain.

L'état de l'animal s'aggrave rapidement au vingt-deuxième jour ; il reste couché au fond de sa cage, presque complètement paralysé et est sacrifié dans le coma le 15 décembre (vingt-troisième jour).

A l'autopsie, la plaie opératoire est cicatrisée. Après ouverture de la boîte crânienne, on constate une grosse réaction méningée du côté inoculé seulement.

Après fixation au formol (F. 592), les coupes frontales font apparaître des lésions à prédominance nettement cortico-méningée. C'est surtout la vallée sylvienne qui est intéressée, toute la fosse insulaire, les lèvres des opercules rolandique et temporal sont largement recouvertes d'une épaisse réaction méningée. Les sillons frontaux sont moins atteints. Au voisinage du sinus longitudinal supérieur, les infiltrats diminuent d'épaisseur.

La propagation strictement méningée dans la vallée sylvienne explique en partie l'abondance des gros vaisseaux qui semblent centrer les infiltrats et qui ont résisté remarquablement. L'artère sylvienne, complètement entourée d'une gangue infiltrative, est encore perméable. Elle montre une limitante élastique interne indemne et une épaisse réaction d'endartérite. Les gros troncs veineux sylviens ont également résisté, les réactions d'endophrébite sont plus atténuées.

Au point de vue infiltratif, les polynucléaires prédominent, les histiocytes montrent moins d'individualité que dans le cas précédent ; ils se nécrosent assez vite et se fusionnent en larges magmas nécrotiques. Dans l'ensemble, la nécrose frappe tous les éléments d'infiltration. Polynucléaires et histiocytes subissent une fonte parallèle. Même dans les zones les plus évoluées on ne peut cependant parler de caséification réelle, les polynucléaires persistent en assez grand nombre.

Pas de réaction fibreuse. Bacilles peu nombreux, disséminés. A distance des infiltrats, en plein parenchyme nerveux, lésions dégénératives importantes sans caractère pathognomonique. La dégénérescence porte aussi bien sur la substance grise avec fontes neuro-ganglionnaires que sur la substance blanche où l'on voit apparaître des cellules névrogliques amiboïdes et de nombreux astrocytes fibreux et protoplasmiques. L'aspect du centre ovale peut être rapproché de certains aspects de gliomatose diffuse.

La myéline est raréfiée et subit une régression marquée, bien qu'incomplète.

Au niveau du tronc cérébral, signalons une méningite basilaire atténuée. Au niveau de l'hémisphère non inoculé, réaction leptoméningée atténuée sans lésions cérébrales.

L'infection s'est propagée aux organes : le *poumon*, le *foie* et la *rate* sont semés de fines granulations grises. A l'examen histologique de ces organes, on trouve dans le poumon une réaction discrète et diffuse de la trame avec quelques nodules folliculaires à périphérie épithélioïde, à centre contenant des polynucléaires désintégrés et des bacilles acido-résistants ; les ganglions trachéo-bronchiques sont hypertrophiés et semés de larges plages épithélioïdes centrées par des polynucléaires désintégrés et contenant des bacilles acido-résistants. Dans la rate, on trouve de nombreux follicules tuberculeux à centre désintégré et contenant des bacilles acido-résistants. Dans le foie, l'infiltration leucocytaire est abondante et les cellules de Kupffer sont hypertrophiées. Dans le rein, congestion et réaction endothéliale.

EXPÉRIENCE III. — Un cynocéphale ♀ est inoculé le 22 novembre 1938 avec une souche de bacilles tuberculeux de type humain isolée d'un lupus (souche L. B., D^r Ducourtioux).

Au bout de trois semaines, l'animal semble moins vif, il maigrit, ne mange guère mais il se rétablit assez rapidement. A la fin du deuxième mois, il a repris son équilibre et le conserve par la suite malgré une abondante suppuration de la plaie cranienne. Il est sacrifié en bon état général au bout de six mois.

A l'autopsie, on constate que la perte de substance osseuse ne s'est pas comblée et laisse sourdre du pus provenant d'un abcès cérébral. Après fixation au formol (G. 334), on note un volumineux abcès cérébral multiloculaire s'étendant sur les coupes frontales de l'hémisphère depuis la tête du noyau caudé et le lobe orbitaire jusqu'en arrière de la terminaison sylvienne, au niveau du carrefour ventriculaire. Abcès multiloculaire dont il est difficile de préciser l'envahissement mais qui atteint surtout le centre ovale, l'opercule rolandique et la fosse sylvienne. Son absence de sphéricité, la multiplicité des diverticules, la membrane discontinue qui le borde, les petits abcès secondaires développés en dehors de cette membrane, sont autant de caractères venant compliquer la morphologie de l'abcès. Il est certain que l'extension s'est faite à la fois par les espaces méningés, les gaines vasculaires et le parenchyme cérébral lui-même.

L'intérieur de l'abcès est exclusivement constitué de polynucléaires plus ou moins confluent, la plupart en dégénérescence granulo-graisseuse. Fait remarquable, *dans cette région centrale nous n'avons pas trouvé de bacilles*. Dès qu'on atteint la paroi de l'abcès, la formule histologique change par suite de l'apparition de nombreux éléments conjonctifs et de réaction fibreuse importante.

Signalons les grandes analogies de cette paroi d'abcès avec les membranes d'abcès cérébraux extirpés par les neuro-chirurgiens. Analogies d'autant plus frappantes qu'il n'existe aucune réaction pathognomonique permettant d'affirmer la nature tuberculeuse du processus. Exceptionnellement de petits infiltrats épithélioïdes font suspecter la nature réelle des lésions, mais il n'existe pas de lésions folliculaires, pas de cellules géantes.

La paroi fibreuse enkystant l'abcès n'a pas d'épaisseur régulière. Elle oscille entre 1 et 2 millimètres, fortement éosinophile et safranophile, elle s'effiloche en quelques points dans le tissu nerveux.

Dans certains abcès secondaires, le contenu devient entièrement

nécrotique, les polynucléaires cessent d'être identifiables ; on aboutit alors, soit à des aspects nettement caséux, soit à des aspects microkystiques. Signalons enfin la présence irrégulière, en certains points d'abcès secondaires, d'infiltrats franchement histiocytaires.

Dans le parenchyme nerveux contigu à l'abcès s'étend une couronne d'encéphalomalacie visible sur les photos, couronne constituant un plan de clivage presque spontané. Au delà du centre ovale, réaction gliale importante et réaction intense de périvascularite.

Les *organes* ne semblent pas touchés à l'œil nu ; cependant, l'examen

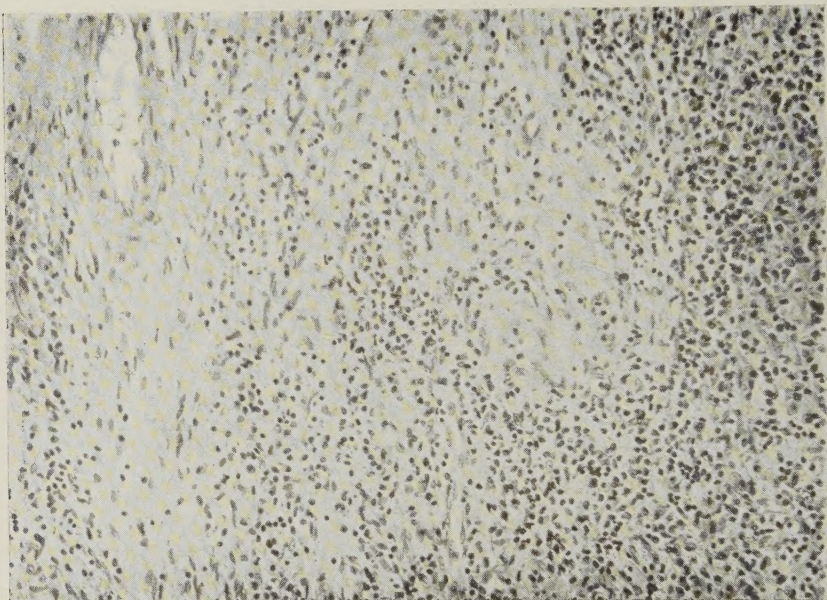


FIG. 4. — Aspect microscopique de la bordure de l'abcès décrit dans le protocole de l'expérience III (souche humaine atténuée L. B) ; infiltration lymphocytaire et réaction conjonctive (G334). Gross. : 200.

histologique fait la preuve de l'imprégnation tuberculeuse de l'organisme ; en effet, dans le *poumon* on trouve de petites plages d'alvéolite épithélioïde dans une trame irrégulièrement épaissie ; dans le *foie*, quelques nodules réactionnels à polynucléaires et cellules géantes ; dans la *rate*, congestion, homogénéisation et nombreux polynucléaires. Dans le *rein*, dégénérescence hyaline de quelques glomérules et quelques petits foyers leucocytaires interstitiels.

EXPÉRIENCE IV. — Un cynocéphale ♀ est inoculé, par voie intracérébrale, le 9 novembre 1938, avec une souche de bacilles tuberculeux de type bovin de virulence éprouvée (souche Dup..., D^r Laporte).

Vers le vingtième jour, l'animal montre des signes de fatigue, la

plaie du crâne suppure ; le lendemain, il s'immobilise au fond de sa cage et, le vingt-deuxième jour, il est sacrifié mourant.

A l'autopsie, les méninges de l'hémisphère inoculé sont épaissies et couvertes de granulations.

Examen histologique (F. 351). — Tubercule cérébral du volume d'une cerise affleurant superficiellement dans la région frontale et s'enfonçant obliquement en dedans et en bas pour atteindre la région des noyaux gris centraux et de la capsule blanche interne. Il se trouve développé principalement dans le centre ovale et atteint en dehors le bord supé-



FIG. 5. — Cerveau de cynocéphale inoculé avec une souche de tuberculose de type bovin (souche Dup..., exp. IV); la méninge de l'hémisphère inoculé est presque entièrement tapissée d'un infiltrat tuberculeux, comblant les sillons (F 351). Grandeur nature.

rieur de la fosse insulaire. Cette lésion n'est pas absolument massive. Elle se montre en réalité constituée par une série de petits nodules tantôt distincts, tantôt en partie confluent. L'ensemble évoque assez bien un aspect cirrhotique. Les nodules élémentaires ainsi constitués consistent surtout en infiltration de polynucléaires dont beaucoup ont subi la fonte granulo-graisseuse. La proportion d'histiocytes est faible; quand ils existent, ils sont presque toujours disposés marginalement. On les rencontre en assez grande abondance au voisinage des espaces méningés ; en quelques rares zones, ils forment une ligne presque continue assez mince, séparant les nodules infectieux du parenchyme nerveux. Le centre des nodules les plus volumineux montre une nécrose assez avancée sans qu'il y ait caséification véritable. Dans l'interstice

des nodules, le parenchyme nerveux, en l'espèce les résidus de substance blanche, montrent de nombreuses réactions de périvascularites presque uniquement lymphocytaires et des réactions gliales aboutissant à la production de nombreuses cellules amiboïdes. L'œdème très



Fig. 6. — Coupe frontale de l'hémisphère gauche représenté figure 5; épaisse réaction méningée occupant la presque totalité de l'hémisphère, abcès encéphalitique multinodulaire développé autour du trajet d'inoculation et lésant les noyaux gris centraux (F351). Coloration par la méthode de Loyez. Gross. : 2,5.

accentué crée au niveau des corpuscules oligogliques des aspects de dégénérescence en grappe.

La méninge est le siège d'un infiltrat tuberculeux diffus étendu à la presque totalité de l'hémisphère ; lésions présentant un caractère folliculaire assez net avec quelques cellules géantes indiscutables. Les réactions histiocytaires et épithélioïdes l'emportent de beaucoup sur les

infiltrats à polynucléaires. Sous le placard de leptoméningite, le cortex cérébral réagit sous forme d'une gliose marginale qui se montre fréquemment infiltrée également par de petits cônes à base marginale, axés ou non par une artériole radiée. Ces cônes d'infiltration sont particulièrement riches en histiocytes.

Les bacilles sont très nombreux, tant dans les méninges que dans les nodules d'infiltration.

L'hémisphère non injecté est également le siège de leptoméningite diffuse avec granulations tuberculeuses bien individualisées, séparées par de larges zones où prédominent l'œdème et les infiltrats leucocytaires. Mêmes particularités que du côté injecté, pénétration du processus tuberculeux dans le cortex marginal sous forme de multiples tubercules en connection manifeste avec les méninges infiltrées.

Pas de réaction méningée basilaire ; le reste du tronc cérébral et le cervelet sont indemnes.

L'infection s'est propagée aux *organes* : hypertrophie de la rate semée de granulations ; quelques granulations sur le foie et le poumon. A l'examen histologique, infiltration diffuse de la trame pulmonaire avec quelques petits nodules histio-lymphocytaires disséminés ; petits nodules réticulo-leucocytaires disséminés dans le foie ; raréfaction lymphoïde de la rate, nodules épithélioïdes dans la pulpe blanche, larges zones de polynucléaires désintégrés.

EXPÉRIENCE V. — Un cynocéphale ♂ est inoculé le 13 janvier 1939 avec une souche bovine de laboratoire (bovine Vallée) isolée d'une lésion du doigt par auto-inoculation accidentelle (souche B. B.).

Dès le vingtième jour, l'animal montre des symptômes de parésie, grimpe difficilement, tombe lourdement. Au vingt-cinquième jour, il est couché au fond de sa cage, complètement paralysé. Il meurt le 11 février (vingt-huitième jour).

A l'autopsie, les lésions méningées, visibles à l'œil nu, ne s'observent que du côté inoculé.

A l'examen histologique (G. 128), on note une infiltration cérébrale diffuse multinodulaire de toute la région frontale et rolandique. Petits nodules de 1 à 2 millimètres de diamètre souvent confluent et se continuant superficiellement par des infiltrats méningés analogues. Au point de vue histologique, ces nodules sont constitués presque exclusivement par des polynucléaires altérés. La fonte granulo-graisseuse est assez avancée pour constituer sur les préparations un aspect spongieux. La nécrose est très accusée, seuls 1/10 ou 1/20 des corpuscules présentent des noyaux colorables. Vers la périphérie, les histiocytes sont très rares et se mêlent aux infiltrats gliaux astrocytaires. Les interstices nodulaires montrent des réactions gliales et vasculaires particulièrement intenses rappelant à première vue des aspects d'astrocytomes. Ce sont en effet les astrocytes fibreux et surtout protoplasmiques qui prédominent ; leur abondance est telle qu'ils ne sont séparés que par quelques μ . Un œdème important dissocie ce tissu et le rend particulièrement friable.

Les réactions vasculaires, très variées, sont si abondantes en certaines zones qu'elles font croire à une réaction angiomateuse. Les péricapillarites sont abondantes, à prédominance lymphocytaire, mais ne constituent pas la majorité. Ce qui prédomine, c'est la multiplication

des capillaires et des veinules dilatés dessinant un lacs à mailles très serrées tout autour des nodules.

Nous devons signaler d'autres aspects singuliers dont l'interprétation nous paraît difficile. Il s'agit de présence fréquente au centre des infiltrats de volumineux vaisseaux souvent artériolisés et dont le calibre considérable ne répond à aucun vaisseau existant normalement dans la région. Ces vaisseaux sont le siège d'endarterite ou d'endophlébite considérables ne parvenant pas toutefois jusqu'à la thrombose totale.

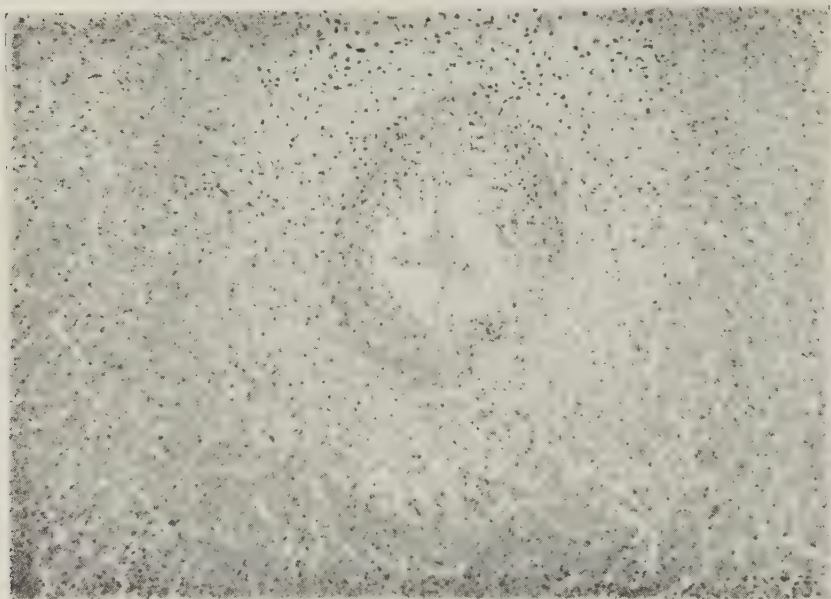


FIG. 7. — Ectasie vasculaire et endarterite au sein d'une zone nécrotique de l'hémisphère cérébral inoculé avec une souche bovine (souche bovine Vallée, exp. V, G128). Gross. : 200.

Pourtour immédiat formé de fibroblastes lâchement anastomosés. Au delà commence la masse nécrotique de l'infiltrat. Ainsi se trouvent constitués des pseudo-périthéliomes. On peut supposer que certains vaisseaux distendus primitivement au voisinage de l'infiltrat ont été englobés secondairement dans celui-ci. Pour une raison qui nous échappe, l'ectasie s'est encore accentuée, les réactions endartériques ne parvenant pas à oblitérer le canal central. L'extrême intensité des réactions gliales et vasculaires, que nous n'avons pas rencontrée jusqu'ici à ce degré, relève probablement d'une toxine particulièrement active.

Dans le parenchyme cérébral, tuméfaction aiguë de l'oligoglie et distension des espaces périganglionnaires.

Dans l'hémisphère opposé, réaction discrète de leptoméningite.

Signalons un degré notable de distension ventriculaire surtout marqué du côté non injecté.

Les lésions des *organes* sont discrètes, visibles seulement à l'examen histologique : infiltration irrégulière et diffuse de la trame pulmonaire avec rares petits îlots histiocytaïres ; infiltration leucocytaire diffuse du foie ; tendance à l'homogénéisation de la rate, infiltration à polynucléaires des sinus et plages nécrotiques sans bacilles visibles.

EXPÉRIENCE VI. — Un cynocéphale ♂ est inoculé le 8 février 1939 avec une souche de bacilles tuberculeux de type bovin fraîchement isolée du cheval (souche Lucien Bernard) et de virulence faible. L'animal meurt le 22 mars ayant présenté des signes d'affaiblissement progressif à partir de la quatrième semaine et une courte période de paralysie terminale (quarante-deuxième jour).

A l'autopsie, l'épaississement des méninges du côté inoculé est apparent à l'ouverture du crâne.

A l'examen histologique (G. 197), l'infiltration cérébrale est moins étendue que dans G. 128. Du volume d'un pois, elle affleure la méninge dans la région frontale moyenne et pénètre dans le centre ovale ; mais en profondeur elle n'atteint ni les noyaux gris centraux, ni la capsule ni le bord supérieur de l'insula qui en reste distant de 6 à 8 millimètres. L'infiltration est moins distinctement divisée en nodules que dans le cas précédent ; il ne s'agit pas simplement d'une confluence mais surtout d'un processus plus diffus qui rend la limitation nodulaire moins bien définie ; les réactions d'infiltration, par leur médiocre limitation, présentent en certains points un aspect encéphalitique. Le gros de l'infiltrat est toujours constitué par des polynucléaires profondément altérés. Leur régression est si complète qu'elle constitue une nappe nécrotique entièrement anucléée, plus rarement quelques noyaux persistent. Vers la périphérie, des nodules d'infiltration gliale se superposent aux infiltrations leucocytaïres mais on ne remarque aucune ébauche de limitation ou d'encapsulation soit par production de fibres collagènes, soit par bande épithélioïde ou histiocytaire.

Dans le parenchyme cérébral, contigu aux infiltrats, les réactions sont très complexes en raison d'intrication des infiltrations gliogènes et hémotogènes. Il existe une certaine distension vasculaire mais ces réactions n'égale pas en intensité celles produites par la bovine Vallée. Nous n'avons pas trouvé non plus d'ectasie vasculaire.

Les réactions de leptoméningite s'atténuent rapidement à quelques millimètres de l'inoculation.

L'hémisphère opposé est indemne. Aucune distension des ventricules médian et latéraux. Le quatrième ventricule, malgré l'absence de méningite basilaire et d'épendymite, est nettement dilaté.

L'examen macroscopique des divers organes ne montre pas de généralisation évidente de l'infection tuberculeuse. Toutefois, le microscope permet de la déceler. On note, en effet, un épaississement de la trame pulmonaire, irrégulièrement congestionnée, une infiltration leucocytaire à type mixte, quelques plages franchement hémorragiques ; des ganglions trachéo-bronchiques hypertrophiés avec prolifération réticulaire diffuse. Dans le *foie*, petits foyers réticulo-leucocytaïres ; dans la *rate*, raréfaction lymphoïde, quelques follicules réactionnels centrés par des polynucléaires désintégréés et des bacilles acido-résistants. Dans le

rein, dilatation et dégénérescence glomérulaires et grosse réaction endothéliale.

EXPÉRIENCE VII. — Un cynocéphale ♀ est inoculé le 22 novembre 1938 avec une souche de bacilles tuberculeux de type aviaire (S. Plum) de virulence éprouvée. La maladie débute au vingt-cinquième jour par des signes d'affaiblissement, de la somnolence ; parésie puis paralysie des membres précédant de peu la mort au vingt-neuvième jour (21 décembre).

A l'autopsie, on constate l'hypertension du liquide céphalo-rachidien

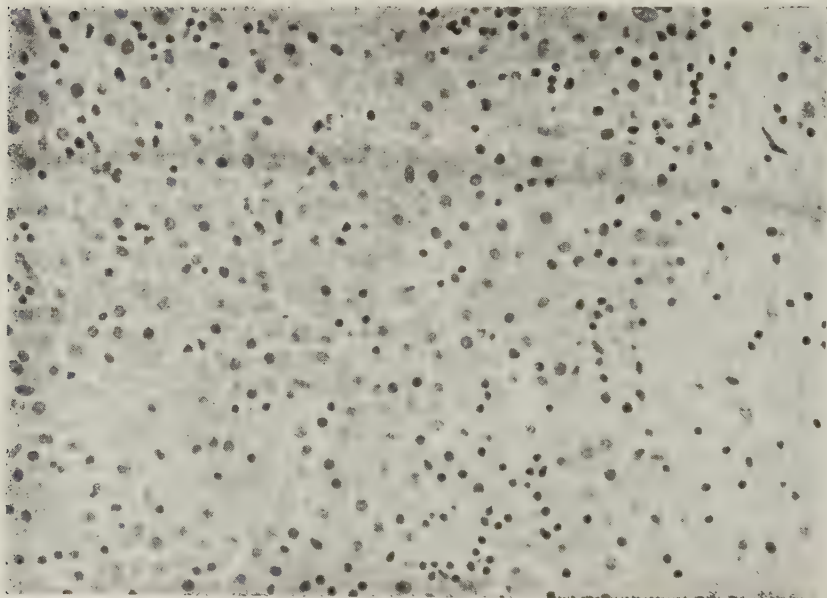


FIG. 3. — Réaction épithélioïde en mosaïque observée en plein parenchyme nerveux à la suite de l'inoculation intracérébrale de bacilles tuberculeux de type aviaire (exp. VII, F611). Gross. : 350.

où l'examen cytologique révélera la présence de nombreux lymphocytes et de rares bacilles acido-résistants. Pas de lésions réactionnelles visibles des méninges dont la surface est lisse mais, sur coupes frontales, la dilatation des ventricules est évidente avec dépression correspondante de l'écorce et congestion des plexus choroïdes.

Examen histologique (F. 611). — Distension notable des ventricules latéraux et en particulier de l'étage temporo-sphénoïdal. Le ventricule médian et le 4^e ventricule ne sont pas dilatés, mais ce dernier est rempli par des plexus choroïdes très épaissis et infiltrés. Sur une coupe frontale assez antérieure, on sectionne sur presque toute son étendue le trajet d'inoculation oblique en bas et en dedans, trajet parvenant jusqu'à l'angle latéral de l'étage ventriculaire supérieur. Sur cette coupe parti-

culièrement intéressante on reconnaît plusieurs dispositions anatomiques :

1° Le nodule d'infiltration du parenchyme cérébral ne déborde pas sensiblement la ligne d'inoculation. Il n'y a pas d'encéphalite diffuse, les réactions de stoppage, en particulier par les histiocytes, sont très complètes et limitent d'emblée l'extension dans le parenchyme nerveux.

2° Par contre, l'atteinte des méninges et des plexus choroïdes est massive. Les différents étages ventriculaires, le 3^e ventricule et surtout le 4^e, montrent des plexus énormes infiltrés de lymphocytes et d'histiocytes confluents ; l'épithélium cylindrique de revêtement est en majeure partie desquamé. Même en dehors des plexus, il existe une réaction diffuse d'épendymite granuleuse.

Les lésions méningées sont extrêmement diffuses. Au niveau de la convexité, bien que partout présentes, elles apparaissent peu à l'œil nu et sont surtout décelables au microscope dans l'épaisseur des sillons. Au niveau du tronc cérébral, les lésions méningées sont considérables. Il existe une épaisse méningite basilaire qui se poursuit latéralement tout autour du bulbe enveloppant celui-ci d'une véritable virole inflammatoire.

L'infiltrat cérébral est de structure assez uniforme et ne comprend que 2 ou 3 nodules aberrants. Sa composition se trouve presque limitée aux histiocytes dont la juxtaposition régulière donne l'impression sur coupes d'une vaste mosaïque. Vers la périphérie, les lymphocytes deviennent très abondants et se groupent généralement en amas denses. Au delà de cette couronne mixte histiolympocytaire, l'infiltration cesse brusquement. C'est à peine si en quelques points apparaît une réaction gliogène avec rares astrocytes fibreux. Signalons cependant un certain nombre de périvascularites, à formule également histiocytaire, à proximité immédiate de l'infiltration. Ces périvascularites s'accompagnent parfois d'ectasie vasculaire.

Les lésions des organes sont minimales, même à l'examen histologique : petits amas histiolympocytaires dans le poumon ; infiltration leucocytaire diffuse et discrète du foie ; prolifération réticulaire et plages épithélioïdes avec polynucléaires dans la rate. Les lésions du rein sont plus importantes : nécrose et infiltration des glomérules, aspect granuleux de nombreux contournés avec sclérose interstitielle.

EXPÉRIENCE VIII. — Un cynocéphale ♂ est inoculé le 9 juin 1938 avec une souche de bacilles tuberculeux de type aviaire (Av. 297, Van Deinse) isolée d'une poule. L'animal meurt au bout de deux mois (10 août), après une courte période de prostration sans paralysie vraie.

A l'autopsie, pas de lésions des méninges et du cerveau, mais granulations tuberculeuses du foie, de la rate et du poumon.

A l'examen histologique (F. 409), ce n'est que sur des coupes relativement épaisses colorées au Nissl que l'on découvre dans la profondeur des sillons frontaux quelques infiltrats lymphocytaires sans participation d'histiocytes ni de polynucléaires.

Le réseau vasculaire est très dilaté mais sans périvascularites ni réactions d'endartérite. La couche sous-piale est œdématiée et montre une réaction gliale modérée. Plexus choroïdes indemnes.

Lésions des organes : le foie, la rate et le poumon montrent des

nodules réactionnels épithélioïdes, parfois *caséux* dans la *rate* et le *poumon*.

EXPÉRIENCE IX. — Un cynocéphale ♂ est inoculé le 22 février 1939 avec des bacilles de la fléole (paratuberculeux). Il ne présente aucun trouble local ou général pendant plus de six mois. Il meurt le 8 septembre, quelques jours après la mobilisation, probablement faute de soins.

A l'autopsie, pas de lésions des méninges, du cerveau ni des organes. A l'examen histologique, rien à signaler (G. 449).

EXPÉRIENCE X. — Un singe callitriche est inoculé, toujours par voie intracérébrale, le 6 janvier 1939 avec 1 goutte d'émulsion provenant d'une ampoule de BCG préparée pour la prémunition infantile.

Il présente au bout d'un mois quelques signes de fatigue mais se rétablit rapidement et son activité reste normale jusqu'au 1^{er} septembre (huit mois). La mobilisation vient troubler le service d'observation et d'alimentation des animaux et le callitriche est trouvé mort le 10 septembre sans avoir présenté de signes de maladie.

A l'autopsie, aucune lésion ni du cerveau, ni des organes et l'examen histologique vient confirmer ces observations. On ne trouve dans le cerveau qu'une faible réaction *lymphocytaire* des méninges et des plexus choroïdes. Il y a de la congestion des organes, foie, rate et poumon, celui-ci présentant un épaississement de la trame par infiltration histio-leucocytaire formant parfois des nappes englobant des alvéoles. On ne trouve *pas de bacilles* acido-résistants.

II. — Synthèse des examens anatomiques.

A. — BACILLES TUBERCULEUX DE TYPE HUMAIN, BOVIN OU AVIAIRE.

Nous étudierons successivement les réactions méningées et les processus encéphalitiques, avec tout ce qu'ils comportent au point de vue infiltratif, lésions péri-vasculaires, œdème, gliose de voisinage.

1^o RÉACTIONS MÉNINGÉES. — Elles sont très variables suivant les cas et suivant la souche utilisée. Elles prédominent constamment du côté inoculé, c'est-à-dire à gauche. L'examen à l'œil nu permet d'évaluer grossièrement l'extension méningée, mais en fait l'infiltration histologique des méninges déborde constamment et de très loin les limites macroscopiques. C'est ainsi que dans notre expérience VII avec une souche aviaire,

les lésions méningées sont invisibles ou douteuses à l'œil nu ; ce n'est qu'au microscope qu'elles sont décelables dans toute l'étendue de la convexité et même dans la région basilaire.

En règle générale, la méningite constitue un placard épais de 1 à 2 millimètres, placard tantôt localisé autour du point d'inoculation (exp. V) dans la région frontale moyenne, tantôt étendu à toute la région frontale et rolandique (exp. I, II) [fig. 1 et 2].

Avec une souche bovine (exp. IV), les réactions méningées sont énormes et s'étendent à toute la corticalité ; elles empiètent même, fait exceptionnel, sur la face interne de l'hémisphère et s'atténuent dans la région basilaire et à la face inférieure du cerveau (fig. 5 et 6).

On ne saurait comparer ces réactions méningées avec les divers aspects de la méningite tuberculeuse chez l'homme, qu'il s'agisse de placards ou de granulations disséminées. Dans tous nos cas où les réactions macroscopiques sont évidentes, la surface des lésions n'est pas lisse, mais présente un aspect chagriné ou en langue de chat. Ceci est dû au caractère nettement exsudatif des lésions, avec participation fibrineuse. Il est impossible d'identifier à l'œil nu une granulation tuberculeuse méningée en raison de la multiplicité et de la complexité des infiltrats.

Presque toujours la méningite infiltrée reste distincte de la corticalité sous-jacente. Dans l'expérience II cependant, avec une souche humaine, la méningite de la fosse insulaire est tellement intense que la substance grise est elle-même infiltrée. Il est impossible de distinguer dans ce placard cortico-méningé une délimitation nette entre les deux formations. C'est par l'intermédiaire des gaines périvasculaires, accompagnant les vaisseaux radiés issus du plexus méningé, que les bacilles tuberculeux et les infiltrats réactionnels gagnent progressivement toute l'épaisseur du cortex.

La formule histologique varie suivant l'intensité et la topographie des lésions méningées. Elle offre un caractère nettement folliculaire et permet dans presque tous les cas, sauf avec la souche aviaire, le diagnostic de tuberculose. Ceci est d'autant plus remarquable que les infiltrats du parenchyme

nerveux ne présentent jamais un caractère folliculaire, et se ramènent constamment à une proportion variable de polynucléaires et de monocytes.

Comment expliquer cette différence réactionnelle entre la méninge et la substance cérébrale, vis-à-vis d'une même souche tuberculeuse ? Il ne s'agit certainement pas d'une teneur différente en bacilles, qui paraissent tout aussi nombreux dans les deux formations. Nous pensons que seule la nature mésenchymateuse de la méninge permet d'expliquer ces réactions folliculaires, celles-ci restant exclues du parenchyme cérébral.

Dans l'infiltrat méningé, il existe une certaine proportion de polynucléaires, variable suivant les cas. Cette réaction n'est jamais pure, elle manque parfois complètement. Même présente, elle cède le pas aux lésions folliculaires.

A distance de la plaque centrale d'inoculation, il est possible de trouver encore des infiltrats nettement folliculaires. Mais peu à peu cette ordination s'estompe, les cellules géantes manquent et on ne retrouve plus que des monocytes sans groupement distinct, mêlés à une proportion modérée de polynucléaires.

2° RÉACTIONS CÉRÉBRALES. — Les souches bovines et humaines déterminent dans le parenchyme cérébral des réactions très comparables. Les lésions se trouvent localisées dans la région frontale et rolandique et se distribuent suivant l'obliquité de l'inoculation, en bas et en dedans, dans toute l'étendue du centre ovale. En bas, elles atteignent le pied de la couronne rayonnante et sont contiguës au noyau caudé, au noyau lentillaire et même au thalamus. Généralement, aucun des noyaux gris centraux n'est lui-même envahi. En dedans, les infiltrats restent à distance de la corne frontale du ventricule et ne touchent que les irradiations du corps calleux. En dehors, les lésions atteignent le voisinage du bord supérieur de l'insula, elles infiltrant directement ou par un œdème de voisinage l'opercule frontal ou rolandique.

Il est remarquable que dans aucune de nos expériences nous n'ayons pu réaliser de véritables tubercules cérébraux, tels qu'on en rencontre en pathologie humaine. Il est vraisem-

blable que nous n'avons pas utilisé une souche convenable et suffisamment atténuée.

Dans un cas seulement (exp. III), une souche humaine a donné un abcès enkysté et fistulisé, peu évolutif et dans lequel se manifestait un processus sclérogène très remarquable (fig. 4).

Dans la plupart de nos expériences, les lésions parenchymateuses du centre ovale restent disséminées ou incomplètement agglomérées. Il persiste toujours entre les nodules infiltratifs des lamelles étirées de substance nerveuse, dans lesquelles les méthodes myéliniques ou cylindraxiles permettent d'identifier de nombreuses fibres nerveuses.

L'absence de fusion des lésions, impuissantes à former un tubercule bien délimité, constitue un fait remarquable et détermine sur les grandes coupes d'ensemble un aspect très spécial que l'on peut qualifier de pseudo-cirrhotique.

Il nous paraît intéressant de rappeler que deux processus pathologiques, de nature entièrement différente, se propagent aussi dans la substance cérébrale d'une manière irrégulière et suivant un rythme en quelque sorte alternant. Nous voulons parler d'une variété de leuco-encéphalite, l'encéphalite concentrique de Balu et de processus glioblastomateux diffus. Il est donc possible que la dissémination de certaines encéphalites et de certains blastomes cérébraux soumise à un rythme alternant, se retrouve en partie dans la variété d'encéphalite tuberculeuse que nous étudions ici.

Les infiltrats parenchymateux. — Dans les expériences se rapportant aux deux souches humaines et aux deux souches bovines virulentes utilisées, les infiltrats parenchymateux ont une composition assez uniforme et présentent un caractère véritablement suppuré, en raison de l'énorme prédominance des polynucléaires (fig. 3). Ces polynucléaires neutrophiles présentent une dégénérescence granulo-graisseuse plus ou moins accentuée ; leur nécrose est parfois assez étendue pour faire disparaître tous les noyaux dans la partie centrale de l'exsudat. Dans ce cas les contours cellulaires restent nets quoique fantomatiques. Même avec une nécrose particulièrement avancée, l'aspect reste toujours distinct de la caséification.

De nombreux histiocytes se trouvent mêlés aux polynucléaires, ils sont particulièrement abondants en marge des

infiltrats. Ce sont de volumineuses cellules, à petits noyaux riches en chromatine, et à condensation protoplasmique marginale. Leur activité phagocytaire très accusée est démontrée par les nombreuses inclusions du cytoplasme : débris chromatiques, granulations lipidiques. Même à son maximum, la proportion des histiocytes reste toujours très inférieure à celle des polynucléaires.

Il est possible d'observer des cellules à deux noyaux, mais nous n'avons constaté ni cellules géantes, ni ordination folliculaire. Sans la démonstration *in situ* de bacilles acido-résistants, il eût été impossible de porter le diagnostic de tuberculose d'après les seuls infiltrats cérébraux.

Il n'existe pas de formule réactionnelle propre aux souches humaines ou aux souches bovines. Polynucléaires et histiocytes coïncident dans les deux séries. Les éléments histiocytaires semblent pourtant moins abondants avec les souches bovines, et dans certains secteurs peuvent manquer complètement.

Les souches aviaires déterminent des infiltrats nettement différents, strictement limités au trajet de l'inoculation et *exclusivement* constitués par des histiocytes, dont la confluence épithélioïde présente un aspect mosaïqué remarquable (fig. 8).

Les deux éléments infiltratifs rencontrés dans le parenchyme cérébral, en proportion aussi variable, semblent répondre à des modes de défense bien distincts.

a) Le polynucléaire est un élément de mobilisation précoce, propre à lutter contre une diffusion rapide des germes virulents. Son origine hématogène est évidente.

b) La cellule histiocytaire est un élément réactionnel tardif, peu mobile, d'une activité locale. Son origine vraisemblablement complexe se fait aux dépens des éléments adventitiels de la microglie et même de la névroglie commune (glie engraisée).

Lésions de voisinage. — Les divers infiltrats sont entourés d'une couronne réactionnelle souvent très étendue.

L'œdème est un élément important qui dissocie les diverses formations anatomiques et constitue autour des foyers une zone clivable. Sur les préparations myéliniques, et en particulier dans l'expérience IV, l'œdème facilement discernable

se traduit par une auréole claire, étendue sur quelques dixièmes de millimètres autour des infiltrats.

Des réactions cellulaires à distance se superposent à l'infiltration oedémateuse.

1° Ce sont avant tout des cellules gliales : cellules amiboïdes, résultant d'une hyperplasie de la névroglie protoplasmique, astrocytes fibreux représentant la névroglie commune. Cette réaction gliale, toujours importante, s'étend à une grande distance des infiltrats. Elle évoque les réactions de gliomatose diffuse et en particulier certaines figures d'astrocytome protoplasmique.

2° Les éléments mésenchymateux sont rares dans les réactions lointaines, alors qu'ils sont confluent, nous l'avons vu, dans les foyers primitifs.

3° L'oligodendrogliose réagit d'une manière constante. Sur les préparations non électives, comme les colorations au Nissl, les noyaux oligodendrocytaires sont entourés d'une plage claire optiquement vide, très élargie. Parfois, quand ces éléments sont groupés, on assiste à un aspect de dégénérescence mucoïde en grappe.

3° RÉACTIONS VASCULAIRES. — Les périvasculaires sont fréquentes au voisinage des nodules. Leur formule est à prédominance lymphocytaire et monocytaire. Les plasmocytes ne s'observent que très rarement ; la tunique adventitielle ne s'organise pas vers la fibrose.

Les périvasculaires histiocytoïdes ne constituent pas le seul mode réactionnel de l'appareil vasculaire. Dans la moitié de nos cas inoculés avec des souches humaines et bovines (exp. I, II, V), les vaisseaux présentaient des réactions singulières que l'on peut rapprocher des processus néoplasiques.

Réactions complexes allant d'une multiplication vasculaire angiomateuse jusqu'à un gigantisme vasculaire, dont la genèse est assez délicate. Dans cette dernière éventualité, les vaisseaux, d'un calibre absolument excessif pour la région intéressée, peuvent être identifiés à l'œil nu. Nous les avons rencontrés non seulement dans des placards de méningite sylviennne et insulaire, mais également en plein centre ovale,

dans l'interstice des infiltrats. Ces vaisseaux groupés, pelotonnés sur eux-mêmes, montrent des lésions considérables d'endartérite ou d'endophlébite ; malgré leur intensité, celles-ci ne parviennent jamais jusqu'à la thrombose totale (fig. 7).

Un examen superficiel laisserait croire à de simples cavernules, résultant de la fonte des foyers encéphalitiques. Il n'en est rien, on vérifie aisément l'existence d'une membrane limitante interne et d'une tunique musculaire. D'ailleurs, c'est au contact des vaisseaux géants que les infiltrats sont le plus denses, et c'est à distance que la nécrose se manifeste. Une telle disposition détermine des aspects périthéliomateux.

Pour expliquer l'histogénèse de telles formations, nous devons admettre que certains vaisseaux au voisinage d'un infiltrat se distendent, se multiplient et engendrent une disposition réellement angiomateuse. Dans un second temps, ils sont englobés dans l'infiltrat. Probablement sous l'action d'une toxine particulièrement active, l'ectasie vasculaire s'accroît encore, sans que les réactions d'endartérite parviennent à oblitérer le canal central.

La plupart des histopathologistes connaissent bien les réactions véritablement néoplasiques que peut déterminer la tuberculose, soit au niveau d'appareils vasculaires, soit dans certains épithéliomes. Indiquons simplement à ce point de vue, en pathologie humaine, le lupus érythémateux et les réactions papillomateuses au cours des tuberculoses annexielle et intestinale.

Lésions choroïdiennes. — Dans toutes nos expériences avec les souches humaines et bovines, les plexus choroïdes se sont montrés absolument indemnes, à tous les étages ventriculaires. L'intégrité choroïdienne chez le singe devant les souches humaines et bovines est fort intéressante. Dans nos recherches antérieures sur le lapin, en effet, nous avons été frappés par la constance et l'intensité des lésions choroïdiennes vis-à-vis des mêmes souches. Ce point de pathologie comparée mérite d'être signalé.

A l'égard des souches aviaires, au contraire, les plexus choroïdes réagissent et montrent une infiltration indiscutable. Tout l'épendyme ventriculaire participe également, il en résulte un degré notable d'hydrocéphalie interne.

B. — BACILLE PARATUBERCULEUX ET BACILLE BCG.

Les lésions anatomiques provoquées par l'inoculation expérimentale de bacilles de la fléole (*Timotheus bacillus*) ou par le bacille avirulent BCG sont absolument insignifiants six mois après l'inoculation. Celle-ci n'a laissé aucune trace appréciable au niveau des méninges ou dans le parenchyme nerveux. D'autre part, l'examen microscopique des divers organes ne révèle aucun signe de généralisation.

III. — Conclusions.

Un certain nombre d'enseignements se dégagent des résultats de la série d'expériences rapportées ci-dessus :

1° Il apparaît d'abord nettement que le singe cynocéphale de Guinée ne se prête pas, comme le lapin, à l'identification des bacilles tuberculeux introduits par la voie intracérébrale. A virulence égale, l'évolution de la maladie expérimentale est sensiblement la même avec les bacilles de type humain et de type bovin ; la mort survient dans des délais peu différents (trois à quatre semaines), avec ou sans paralysie, après une courte période de prostration et de somnolence.

Seul, un bacille humain de virulence très atténuée a permis la survie de l'animal au delà de six mois. Ce cas est particulièrement intéressant et nous y reviendrons.

En ce qui concerne le bacille aviaire, une des souches virulentes utilisées a entraîné la mort dans les mêmes conditions que les bacilles de type mammifère ; la deuxième a provoqué une maladie de plus longue durée mais également fatale (quarante-deux jours).

2° Les lésions locales des méninges et du parenchyme nerveux se sont révélées très voisines, au point de vue topographique et morphologique, avec les diverses souches de type mammifère expérimentées. Une discrimination entre souches bovines et souches humaines, basée sur des caractères histopathologiques, serait pratiquement impossible. Le bacille

aviaire, par contre, se sépare à cet égard des deux types précédents. Il nous paraît nécessaire d'insister sur les points suivants :

a) La réaction causée par les bacilles *humains ou bovins virulents* s'est montrée précoce, sévère, étendue à la majeure partie de l'hémisphère inoculé, et s'est caractérisée par des infiltrats en nappe de leucocytes *polynucléaires* neutrophiles. Ces infiltrats pénètrent profondément dans le parenchyme nerveux, formant de véritables abcès nodulaires plus ou moins confluents suivant les cas, s'étalant largement ou réalisant un certain essaimage (fig. 2 et 6).

La réaction histiolympocytaire, en pareil cas, se limite aux méninges et au pourtour des infiltrats; les cellules géantes sont rares ou absentes; la nécrose caséuse vraie n'a pas été observée mais les amas de polynucléaires sont l'objet d'une désintégration rapide.

b) Les mêmes germes provoquent des *réactions vasculaires* très accusées. La multiplicité des capillaires sanguins et des vaisseaux de moyen calibre est si grande qu'elle réalise un aspect anatomique comparable à l'*angiome*. Tous ces vaisseaux sont en ectasie manifeste et leurs endothéliums en prolifération active. Ils conservent néanmoins leur perméabilité (fig. 2 et 7).

c) La prolifération gliale est toujours très marquée; cellules névrogliales et astrocytes apparaissent en grand nombre dans la substance blanche et aussi dans la substance grise où les fontes neuro-ganglionnaires ne sont pas rares.

d) Les bacilles acido-résistants sont peu nombreux et disséminés dans les infiltrats à polynucléaires, plus denses dans les zones histiocytaires ou épithéliales.

e) La réaction inflammatoire locale est d'un caractère différent après inoculation de bacilles *du type aviaire* : les lésions méningées diffuses, peu visibles à l'œil nu, intéressent principalement la *base* du cerveau et le tronc cérébral. Les infiltrats encéphalitiques, qui ne débordent guère le trajet d'inoculation, sont du type *histiolympocytaire* et même nettement *épithélioïde*. L'atteinte des *plexus choroïdes* doit être signalée ainsi que la dilatation ventriculaire.

3° La généralisation de l'infection tuberculeuse aux viscères

est rarement visible à l'examen macroscopique : en ce qui concerne les animaux inoculés avec des souches humaines ou bovines, le microscope montre cependant la présence de nodules folliculaires dans les *ganglions trachéobronchiques*, le *parenchyme pulmonaire*, le *foie* et la *rate*. Des bacilles acido-résistants peuvent être mis en évidence dans ces lésions. Au niveau du rein, les troubles, d'ordre congestif ou dégénératif, ne s'accompagnent pas de formations réactionnelles spécifiques.

Chez les animaux inoculés avec une souche aviaire, les divers organes ne présentent qu'une *hyperplasie réticulaire diffuse* et quelques plaques épithélioïdes. Le rein seul est sévèrement touché et ses lésions — dégénérescence granuleuse des tubes contournés, nécrose glomérulaire — semblent *d'origine toxique*.

L'épreuve intracérébrale chez le cynocéphale sépare donc nettement les souches de bacilles tuberculeux de type aviaire des souches appartenant aux deux types mammifères.

4° Une *souche humaine, de très faible virulence*, isolée d'un cas de lupus, a déterminé la formation d'un abcès cérébral multiloculaire très étendu, atteignant principalement le centre ovale, l'opercule rolandique et la vallée sylvienne. Cet abcès, formé par des polynucléaires en dégénérescence granulo-graisseuse, s'entourait d'une zone de prolifération conjonctive *fortement sclérosée*. Pas de nodules folliculaires, pas de réaction histiocytaire notable, pas de cellules géantes et bacilles très rares. Tout autour de l'abcès existe dans le parenchyme nerveux une *zone de clivage* semblant préparer l'élimination des tissus nécrosés et qui aurait permis, semble-t-il, l'énucléation chirurgicale de cet abcès. Pareille structure évoque l'aspect anatomique et histologique des abcès cérébraux d'origine inconnue observés chez l'homme et dont la neurochirurgie pratique, assez souvent avec succès, l'exérèse.

Dans le cas expérimental qui nous occupe, l'abcès, malgré son volume, n'a pas entraîné la mort. Il paraît vraisemblable que l'animal, sacrifié au bout de six mois et n'ayant rien perdu de sa vitalité, eût réussi à cicatriser sa lésion cérébrale après élimination des éléments nécrosés. D'autre part, les lésions tuberculeuses observées dans les organes restaient discrètes,

sans tendance évolutive, et on peut dire que l'animal luttait avec succès contre le développement de l'infection.

Il est possible qu'un certain nombre d'abcès cérébraux, tardivement opérés chez l'homme et dont l'examen histobactériologique se montre impuissant à établir l'origine tuberculeuse, se sont formés sous l'influence de bacilles de Koch peu virulents que la résistance locale a détruits peu à peu ou dégradés au point de les rendre inoffensifs. La disparition des bacilles qui étaient à l'origine de la formation de l'abcès ou leur altération profonde expliquerait l'échec constant des tentatives d'inoculation expérimentale observé en pareil cas.

Quoi qu'il en soit, il est intéressant de constater qu'une souche de tuberculose de type humain, atténuée il est vrai, mais inoculée dans le cerveau d'un animal sensible, le singe neuf, ce qui constitue pour cet animal une épreuve sévère, se montre incapable de déterminer chez lui une tuberculose évolutive. Le bacille inoculé n'était pas cependant dépourvu de pouvoir pathogène ; l'intensité de la réaction locale le prouve et aussi l'essaimage discret dans quelques organes.

5° Il est suggestif, à cet égard, de rapprocher les résultats observés de ceux qui ont été obtenus chez le même animal par inoculation intracérébrale d'un autre bacille atténué de type bovin, le BCG (expérience X) : *absence complète de propagation de l'infection aux organes, aucune trace locale de l'inoculation après six mois*. Il est évident que le bacille-vaccin de Calmette-Guérin a subi, du fait des passages prolongés sur milieu bilié, une transformation biologique profonde et définitive que traduit la perte totale de la virulence.

Son action sur le cerveau du singe est comparable à celle que nous avons observée à la suite de l'inoculation par la même voie du bacille de la fléole, acido-résistant du groupe paratuberculeux, naturellement avirulent.

6° A défaut de différences tranchées entre les réactions provoquées par les divers types de bacilles tuberculeux, les inoculations intracérébrales pratiquées sur le singe cynocéphale mettent en relief l'écart considérable qui peut séparer, du seul point de vue de la virulence, deux souches appartenant au même type.

En montrant les possibilités de défense tissulaire du paren-

chyme nerveux vis-à-vis de certaines souches atténuées, ces expériences laissent supposer que le processus d'auto-stérilisation décrit par Levaditi et Nicolau à propos des ectodermoses neurotropes peut entrer en jeu chez l'homme dans les cas les plus favorables d'abcès cérébraux d'origine tuberculeuse et les orienter vers la régression spontanée ou la guérison après exérèse chirurgicale.

**DÉTERMINATION DU TITRE ANTITOXIQUE
DES SÉRUMS ANTI-PERFRINGENS,
ANTI-VIBRION SEPTIQUE, ANTI-HISTOLYTIQUE
ET ANTI-ŒDEMATIENS**

**PRÉPARATION, TITRAGE ET PROPRIÉTÉS
DES TOXINES CORRESPONDANTES**

(CINQUIÈME MÉMOIRE)

TOXINE ET ANTITOXINE DU B. ŒDEMATIENS *

par MAYLIS GUILLAUMIE.

(Institut Pasteur.)

Dans des mémoires antérieurs, nous avons montré que les résultats obtenus au cours de la détermination du titre antitoxique d'un même sérum anti-*perfringens* A, purifié ou non, présentent entre eux de fréquentes discordances lorsque les titrages sont réalisés avec divers échantillons de toxine homologue ; nous avons signalé, en outre, que le titre anti-hémolytique de ce sérum peut varier aussi avec l'échantillon de toxine correspondante utilisé dans le titrage (1) et qu'il n'y a

(*) Synonyme : *Clostridium oedematiens*.

(1) Du fait que le titre anti-hémolytique d'un même sérum anti-*perfringens* A varie avec l'échantillon de toxine homologue utilisé au cours des titrages effectués en présence des globules rouges de mouton, nous avons conclu que la toxine *B. perfringens* type A (souche Lechien), doit contenir plusieurs substances hémolytiques pour les hématies de mouton (Ces *Annales*, **66**, 1941, p. 329). Nos recherches antérieures sur le titrage des sérums préparés avec les antigènes du *B. perfringens* type C (*B. paludis* de Mc Ewen ; synonyme : *Welchia agni*, var. *paludis*), nous avaient montré que le titre anti-hémolytique de ces sérums dépend de l'échantillon de toxine *perfringens* C employé dans le dosage (M. WEINBERG et M. GUILLAUMIE, *Revue d'Immunologie*, **2**, 1936, p. 513). Ces résultats appuient la notion de l'existence aussi dans la toxine du *B. perfringens* C de plusieurs substances hémolytiques pour les globules de mouton.

pas toujours de parallélisme entre les titres antitoxiques et anti-hémolytiques évalués avec les mêmes échantillons de toxine. De plus, nous avons établi que la « dose-test » de la toxine *perfringens* dépend plus ou moins du sérum étalon employé pour effectuer la détermination. De ces observations, il ressort nettement que le problème du titrage de la toxine *perfringens* et de l'antitoxine correspondante est extrêmement complexe.

En examinant la question du titrage des sérums anti-vibron septique (2) et anti-histolytique (3) nous avons constaté, d'une part, que suivant l'échantillon de toxine vibron septique utilisé pour titrer un sérum correspondant les résultats obtenus, généralement voisins, diffèrent parfois de 25 p. 100 et, d'autre part, que l'écart entre les chiffres trouvés au cours du titrage d'un même sérum anti-histolytique avec une « dose-test » de différents échantillons de toxine homologue est de 16 p. 100 au plus.

Poursuivant cette étude de l'estimation du pouvoir antitoxique des sérums anti-gangréneux, nous avons aussi abordé celle du titrage des sérums anti-œdématis. Pour la réaliser, nous avons été amenée à préparer de nombreux échantillons de toxine œdématis. Dans la première partie de l'exposé qui va suivre, nous indiquons la nature des bouillons qui nous ont permis d'obtenir les meilleures toxines, les procédés de dosage que nous avons employés, les valeurs de la « dose-test » des toxines œdématis titrées parallèlement avec deux sérums étalons et les résultats du titrage d'un même sérum anti-œdématis avec plusieurs échantillons de toxine homologue.

Dans la deuxième partie, nous comparons les techniques mises en œuvre dans divers pays pour déterminer la « dose-test » des toxines œdématis, *perfringens*, vibron septique et histolytique : nous notons ensuite le procédé uniforme que nous avons adopté pour titrer les immunsérums correspondants. Puis, après avoir indiqué les coefficients qui permettent

(2) WEINBERG (M.) et GUILLAUMIE (Maylis). *C. R. de la Soc. de Biol.*, 127, 1938, p. 1084. — GUILLAUMIE (Maylis). *Ces Annales*, 67, 1941, p. 112.

(3) GUILLAUMIE (Maylis). *Ces Annales*, 66, 1941, p. 389.

de convertir en unités antitoxiques internationales les titres des sérums antigangréneux notés en unités nationales, nous précisons, sous forme de tableau, le mode de préparation des toxines dont nous avons fait usage au cours de l'étude d'ensemble que nous avons réalisée sur le titrage des sérums anti-*perfringens*, anti-vibron septique, anti-histolytique et anti-*œdematiens* ; nous rappelons en outre les quantités moyennes de toxine liquide ou précipitée que nous avons obtenues et les valeurs de leur dose minima mortelle.

PREMIÈRE PARTIE

I. — PRÉPARATION DE LA TOXINE DU *B. ŒDEMATIENS*

Pour obtenir de la toxine *œdematiens*, nous utilisons des bouillons à base de viande et de foie de bœuf ou divers bouillons préparés avec des tissus de cheval. Les premiers sont ajustés à pH 7,9-7,95 et les autres à pH 7,7 avant la stérilisation. Ces différents bouillons sont répartis dans des flacons de 5 litres en verre pyrex, stérilisés à 110° pendant vingt-cinq minutes (4), puis rapidement amenés à la température de 37° dans un bain-marie et finalement ensemencés avec 60 cent. cubes environ d'une culture de vingt à vingt-quatre heures de *B. œdematiens* (5) faite généralement dans du bouillon Vf de bœuf, parfois dans du bouillon Vf de cheval. Après quatre ou cinq jours d'étuve à 37°, les

(4) Au cours de la stérilisation, l'alcalinité des bouillons diminue généralement. Voici, en effet, le pH de 20 bouillons de bœuf stérilisés ; pH 7,65 ou 7,7 : 5 bouillons ; pH 7,7 à 7,85 : 5 bouillons ; pH 7,85 et 7,9 : 6 bouillons ; pH 7,95 : 2 bouillons ; pH 8 et 8,1 : 2 bouillons. Signalons en passant que le développement du *B. œdematiens* est défectueux dans les bouillons Vf à pH 8-8,1 et que le titre de la toxine *œdematiens* obtenue dans des bouillons Vf ensemencés à pH 5,8 est au moins égale à 2.000 D.M. par centimètre cube (titrages sur souris, voie sous-cutanée).

(5) Comme souche de *B. œdematiens*, nous utilisons la souche Delombe. Nos premières préparations de toxine ont été réalisées à partir de cette souche aussitôt après qu'elle avait subi deux passages sur cobayes ; tous les échantillons que nous avons préparés depuis juillet 1938 proviennent de cultures faites à partir d'un exemplaire de cette souche conservé en tube scellé depuis 1917 : après repiquage dans du bouillon Vf de bœuf (pH 7,7-7,8) et sans passage préalable sur animal, elle nous permet régulièrement d'obtenir des toxines très nocives.

cultures sont filtrées sur bougie L 2 et la toxicité est déterminée par la méthode des injections sous-cutanées à des souris de 17 à 20 grammes (le volume de toxine diluée injecté à chaque souris est de 0 c. c. 5).

Les pertes de toxine au cours de la filtration sur bougie sont généralement importantes lorsque de grands volumes de culture sont filtrés après une simple centrifugation. Nous avons obvié à cet inconvénient en clarifiant préalablement les cultures avec de la célite ajoutée à raison de 2 grammes par litre (célite n° 503) ; après agitation, suivie de filtration sur papier, on effectue la filtration sur bougie stérile.

A. — Titre de la toxine liquide.

1° TOXINE PRÉPARÉE DANS DU BOUILLON VF DE BŒUF.

Le titre des 43 derniers échantillons de toxine *œdematiens* que nous avons préparés dans des bouillons Vf de bœuf, ajustés avant la stérilisation à pH 7,9-7,95, a été le suivant : 6 préparations ont contenu, par centimètre cube, 2.000 ou 2.000 à 3.000 doses mortelles (D.M.) ; 20 préparations : 3.000 à 6.000 ; 17 : 8.000 à 12.000 et 2 : 12.000 D.M. par centimètre cube.

Voici quelques exemples :

	NOMBRE DE D. M. par centimètre cube
Toxine du 17 novembre 1939	6.000 à 8.000
Toxines du 9 février, des 6 et 13 octobre 1939. . .	8.000
Toxine du 16 février 1940	8.000 à 10.000
Toxine du 12 janvier 1940.	10.000
Toxine du 25 septembre 1940.	10.000 à 12.000
Toxines du 6 avril et du 6 mai 1940	12.000

Le pH des toxines centrifugées après cinq jours d'étuve varie généralement entre 7 et 7,5.

2° TOXINE PRÉPARÉE DANS DU BOUILLON VF ADDITIONNÉ DE DIFFÉRENTES SUBSTANCES.

D'après Scott (6) les sels ferriques exaltent la virulence du *B. œdematiens* ensemencé dans des bouillons de foie + cerveau (7) ; Sordelli,

(6) SCOTT (J. P.). *J. infect. Diseases.*, 38, 1926, p. 511.

(7) EALES (C. E.) [*Austral. Veter. Journ.*, février 1934, p. 25] signale, par contre, que la toxicité du *B. œdematiens* diminue après plusieurs repiquages dans du bouillon de foie + 2 p. 100 de chlorure de fer.

Ferrari et Meyer (8) améliorent la production de la toxine *œdematiens* dans les bouillons de viande en ajoutant de la viande dans le fond des flacons ; ils recommandent aussi l'addition de 5 p. 100 de gélatine. Barg (9) utilise un milieu fermenté et des conditions anaérobies strictes. Celarek et Stetkiewicz (10) mettent des morceaux de viande de veau dans du bouillon ordinaire recouvert de paraffine. Walbum et Reymann (11), en comparant l'élaboration de la toxine dans le milieu Martin, dans le bouillon ordinaire additionné de peptone Witte ou de peptone Difco, dans un bouillon de foie de cheval additionné de 1 p. 100 de peptone Riedel, ont obtenu de bonnes toxines dans tous les cas, mais dont le titre cependant n'a jamais été supérieur à celui des toxines préparées dans les bouillons de veau additionnés de 1 p. 100 de peptone Riedel (tous leurs milieux ont été débarrassés des hydrates de carbone par le *B. coli* avant d'être ensemencés avec le *B. œdematiens*).

L'adjonction au bouillon Vi de 1,5 p. 1.000 de peptone pepsique PBC ou de peptone pancréatique Defresne, de 5 p. 1.000 de peptone Chapoteaut ou de 1 p. 100 de peptone Riedel (12), n'a pas provoqué d'une manière constante une amélioration marquée de la toxinogénèse.

Le sang desséché de cheval, fréquemment ajouté aux concentrations de 1 à 2 grammes par litre dans les bouillons destinés à la production de la toxine tétanique (13), a été employé dans nos essais aux doses de 1 et 1 gr. 5 p. 1.000. Il a toujours déclenché le développement rapide du *B. œdematiens*, mais n'a augmenté l'élaboration de la toxine que dans deux cas où les bouillons employés étaient très peu nutritifs. Le titre de la toxine obtenue dans un de ces bouillons a été de 2.000 D.M. par centimètre cube et celui de la toxine obtenue dans le même bouillon additionné de 1,5 p. 1.000 de sang desséché, de 4.000 à 5.000 D.M. par centimètre cube.

(8) SORDELLI (A.), FERRARI (J.) et MEYER (E.). *Rev. Soc. Argent. Biol.*, **4**, 1928, p. 907.

(9) BARG (G. S.). *Z. Immunitätsforsch.*, **79**, 1933, p. 187.

(10) CELAREK (J.) et STETKIEWICZ (S.). *C. R. de la Soc. de Biol.*, **122**, 1936, p. 143.

(11) WALBUM (L. E.) et REYMANN (G. C.). *J. Path. a. Bact.*, **46**, 1938, p. 315-322.

(12) Le pH des bouillons additionnés de peptone est réajusté à 7,9 avant la stérilisation.

(13) RAMON (G.). *Revue d'Immunol.*, **6**, 1940, p. 394.

3° TOXINE PRÉPARÉE

DANS DES BOUILLONS FAITS AVEC DES TISSUS DE CHEVAL.

a) DIGESTION CHLORHYDROPEPSIQUE DE FOIE.

Turner et Davesne (14), en ensemençant de la bouillie de foie de mouton avec une souche de *B. œdematiens* isolée chez un mouton atteint de « Braxy », ont obtenu au bout de vingt heures une toxine qui tuait la souris à 1/200 de centimètre cube.

Dans nos essais, nous avons utilisé des digestions chlorhydropepsiques de foie de cheval. Nous ne reviendrons pas ici sur leur mode de préparation ; nous signalerons seulement que le sang desséché (1,5 p. 1.000) ou la peptone Defresne (5 p. 1.000) augmentent leur valeur nutritive. Exemple : les toxines préparées le 9 octobre 1940 dans un bouillon de foie additionné de sang ou de peptone ont contenu, après quatre jours d'étuve, 3.000 à 4.000 doses mortelles par centimètre cube, et la toxine obtenue dans le bouillon de foie seul : 2.000 doses mortelles par centimètre cube.

b) DIGESTION CHLORHYDROPEPSIQUE DE VIANDE ET DE FOIE DE CHEVAL (Vf de cheval).

Au cours d'expériences comparatives nous avons observé que le bouillon Vf de cheval permet d'obtenir de meilleures toxines que les digestions chlorhydropepsiques de foie seul.

L'addition de foie cru ou cuit (foie de cheval) à des bouillons Vf de cheval ne favorise pas l'élaboration de la toxine dans ces bouillons.

Le sang desséché de cheval accélère le début de la culture sans cependant intensifier la toxinogénèse. Voici le titre, exprimé en doses minima mortelles par centimètre cube, des 15 préparations que nous avons effectuées dans du bouillon Vf de cheval additionné de 1,5 p. 1.000 de sang desséché : 4.000, 4.000 à 6.000 et 6.000 (8 préparations) ; 6.000 à 8.000, 8.000 et 10.000 à 12.000 (5 préparations) ; 20.000 et 20.000 à

(14) TURNER (W.) et DAVESNE (J.). Ces *Annales*, **41**, 1927, p. 1078 ; *C. R. de la Soc. de Biol.*, **96**, 1927, p. 921.

30.000 (2 préparations). Ces résultats indiquent que le bouillon Vf de cheval, ensemencé dans les conditions indiquées, est aussi favorable à la production de la toxine *œdematiens* que le bouillon Vf de bœuf.

Dans les bouillons additionnés de 5 p. 1.000 de peptone Riedel, nous n'avons pas obtenu de meilleures toxines que dans les bouillons Vf + 1,5 p. 1.000 de sang desséché. La peptone Defresne, à la concentration de 5 p. 1.000, n'a pas amélioré d'une manière constante la valeur nutritive du bouillon Vf de cheval. Dans les bouillons Vf additionnés de 5 p. 1.000 de peptones Defresne ou Riedel, puis débarrassés de leurs hydrates de carbone par un ensemencement avec du *B. coli* selon la technique de Walbum et Reymann, la toxine *œdematiens* ne se forme pas en quantité plus grande que dans les mêmes bouillons non soumis à une fermentation par le *B. coli*.

B. — Toxine précipitée par le sulfate d'ammonium.

Après filtration sur bougie, la toxine *œdematiens* est additionnée de 600 à 700 grammes par litre de sulfate neutre d'ammonium pur. La toxine précipitée est recueillie, desséchée et conservée comme nos divers échantillons de toxine *perfringens*, vibrion septique ou histolytique.

a) POIDS DE TOXINE OBTENU PAR LITRE.

Tous nos échantillons de toxine *œdematiens* précipitée (OE 1, OE 2, ..., OE 13) ont été préparés dans les mêmes conditions à partir de différents lots de bouillon Vf de bœuf ; les poids de toxine précipitée par litre de bouillon ensemencé ont différé notablement : dans nos observations, ils varient de 2 gr. 420 à 11 gr. 500 (tableau I). Le poids moyen obtenu au cours de 12 préparations est de 6 grammes par litre.

Le sulfate d'ammonium précipite 26,2 à 87,5 p. 100 de la toxine présente dans le bouillon filtré cinq jours après l'ensemencement (tableau I) ; moyenne de 7 préparations : 56,7 p. 100 (15).

(15) Rappelons que, dans nos recherches, les quantités moyennes de toxine *perfringens*, vibrion septique ou histolytique précipitées par le sulfate d'ammonium s'élèvent respectivement à 58,1, 62,2 et 58,6 p. 100 de la quantité existant dans les cultures centrifugées. Ces *Annales*, 56, 1941, p. 228 et 229 ; 67, 1941, p. 117 à 119.

TABLEAU I. — Dose minima mortelle de 13 échantillons de toxine œdematiens précipitée par le sulfate d'ammonium. Poids sec de toxine obtenu par litre de bouillon.

ÉCHANTILLONS DE TOXINE du <i>B. œdematiens</i> (date)	POIDS SEC de la toxine précipitée par litre de bouillon (gr.)	DOSE MINIMA MORTELLE		POURCENTAGE de toxine précipitée
		Toxine liquide (c. c.)	Toxine précipitée (milligr.)	
OE ₄ 10 mars 1935			0,0045	
OE ₉ 12 mars 1936	11,500	1/3.000	0,0045	85,2
OE ₃ 3 décembre 1937 . . .	2,420		0,002	
OE ₄ 5 avril 1937	5,250		0,0075	37,8
OE ₅ 25 août 1938	8,750	1/10.000	0,010	87,5
OE ₆ 28 septembre 1938 . .	3,720		0,001	
OE ₇ 20 octobre 1938 . . .	8,200		0,0025	
OE ₈ 10 novembre 1938 . .	4		0,0015	
OE ₉ 22 décembre 1938 . .	2,200	1/6.000	0,0018	26,5
OE ₁₀ 9 mars 1939	5	1/8.000	0,0009	69,4
OE ₁₁ 20 juillet 1939 . . .	5,100		0,0035	
OE ₁₂ 20 octobre 1939 . . .	6,250	1/1.350	0,005	35,7
OE ₁₃ 8 décembre 1939 . .	9,875	1/1.300	0,006	54,8

b) DOSE MINIMA MORTELLE DE LA TOXINE PRÉCIPITÉE.

1° TITRAGES PAR VOIE SOUS-CUTANÉE. — Nous avons précisé la dose minima mortelle (D.M.M.) de tous nos échantillons de toxine œdematiens par le procédé des injections sous-cutanées à la souris et dans 9 cas nous avons comparé la valeur ainsi déterminée à celle que l'on obtient par le procédé des injections intraveineuses au même animal. Par dose de toxine essayée, nous avons injecté 4 à 8 souris de 17 à 20 grammes.

La D.M.M. moyenne des 13 échantillons de toxine que nous avons titrés par voie sous-cutanée est de 0 milligr. 0038. En examinant, dans le tableau I, les valeurs des D.M.M. de tous ces échantillons nous voyons qu'elles sont comprises entre 0 milligr. 0009 (toxine OE 10) et 0,006 (toxine OE 13).

A l'état sec, la toxine œdematiens est très stable. La valeur de la D.M.M. des échantillons OE 1, OE 2 se maintient inchangée depuis quatre et cinq ans.

2° TITRAGES PAR VOIE VEINEUSE. — Les résultats du tableau II indiquent que les valeurs des D.M.M. déterminées par voie

TABLEAU II. — Dose minima mortelle et « dose-test » de 11 échantillons de toxine œdématis. Titrages par voies sous-cutanée et veineuse.

ÉCHANTILLONS de toxine œdématis	DOSE MINIMA MORTELLE		« DOSE-TEST » déterminée avec un sérum étalon		
	Voie sous- cutanée	Voie veineuse	FRANÇAIS		DANOIS
			Voie sous- cutanée	Voie veineuse	Voie sous- cutanée
	(milligr.)	(milligr.)	(milligr.)	(milligr.)	(milligr.)
OE	0,015	0,043	0,88	0,88	8,8
OE ₁	0,0045		0,45		
OE ₂	0,0045	0,015	1,20-1,15	1,10-1,15	11,9
OE ₃	0,002	0,0045	0,30-0,31	0,30-0,31	3,1
OE ₄	0,0075	0,015	1,20-1,25	1,30-1,25	12,8
OE ₅	0,010	0,018	1,2	1,15	
OE ₆	0,001	0,003	0,36	0,35	
OE ₇	0,0025	0,025	0,53		4,8
OE ₈	0,0015	0,0065	0,29		3,3
OE ₉	0,0018	0,006	0,33		3,8
OE ₁₀	0,0009		0,45		4,6

veineuse sont, en général, deux à quatre fois plus élevées que les valeurs obtenues au cours des titrages par voie sous-cutanée. La valeur moyenne des D.M.M. déterminées par voie veineuse est de 0 milligr. 015.

c) DÉTERMINATION DE LA « DOSE-TEST »
D'UNE TOXINE œdématis.

Le Comité d'Hygiène de la Société des Nations a proposé en 1935 le procédé des injections intramusculaires à la souris pour déterminer soit la « dose-test » de la toxine œdématis, soit le titre antitoxique des sérums correspondants. Utilisée par Walbum et Reymann (1935), par Borthwick, par I. Bengston (1936), cette méthode a été critiquée par H. W. Glotova (16) qui considère le procédé des injections intraveineuses nettement plus précis.

Au cours d'une série de titrages, nous avons appliqué comparativement la technique des injections sous-cutanées et celle des injections intraveineuses pour déterminer la « dose-test »

(16) GLOTOVA (H. W.). Ces Annales, 59, 1937, p. 526.

de différents échantillons de toxine ; nous avons utilisé un sérum étalon français contenant 100 unités par centimètre cube (17) et nous avons considéré comme valeur de la « dose-test » de chaque échantillon le poids de toxine qui, mélangé à une unité antitoxique de ce sérum, tue environ la moitié des souris auxquelles on injecte un tel mélange.

Parallèlement, nous avons précisé la « dose-test » des toxines au moyen du sérum international.

1° VALEUR DE LA « DOSE-TEST » DÉTERMINÉE AVEC LE SÉRUM ÉTALON FRANÇAIS. — Pour déterminer la « dose-test » d'une toxine nous faisons une série de mélanges contenant la même quantité de sérum étalon (10 unités), des quantités croissantes de la toxine à titrer et de l'eau physiologique pour amener le volume de tous les mélanges à 5 cent. cubes ; nous les maintenons pendant une heure à 37°, puis de chacun d'eux nous injectons 2 à 4 souris par voie sous-cutanée et autant par voie veineuse (0 c. c. 5 par souris). Ce premier essai indique l'ordre de grandeur de la « dose-test » de l'échantillon de toxine examiné ; nous en effectuons un deuxième pour contrôler et préciser les résultats du premier, en prenant soin au cours de cette vérification d'injecter, de chaque mélange, 4 souris par voie veineuse et 4 par voie sous-cutanée, de sorte que, finalement, pour chaque dose de toxine essayée au cours de ces deux essais, le nombre total de souris injectées est de 6 à 8 par voie veineuse et de 6 à 8 également par voie sous-cutanée (poids des souris utilisées : 48 et 49 grammes). Nous prenons comme valeur de la « dose-test » de l'échantillon de toxine ainsi titré la dose qui tue la moitié des souris injectées.

De telles déterminations répétées à plusieurs mois d'intervalle nous ont donné des résultats extrêmement voisins, sinon identiques. Nous en rapportons quelques-uns dans le tableau II. C'est dire que le procédé des injections par voie sous-cutanée offre la même sécurité, la même sensibilité, que celui des injections intraveineuses tout en présentant une plus grande facilité d'exécution.

(17) Une unité antitoxique de ce sérum neutralise 100 doses minima mortelles de l'échantillon de toxine OE 1 (titrage sur souris, voie sous-cutanée).

Les résultats des injections sous-cutanées indiquent qu'une « dose-test » de toxine *œdematiens*, déterminée avec le sérum étalon français, représente un nombre de doses mortelles généralement compris entre 100 et 230, mais parfois égal à 58 ou à 360. En effet :

	DOSES MORTELLES
Une « dose-test » de la toxine OE	58
Une « dose-test » de la toxine OE ₁	100
Une « dose-test » de la toxine OE ₂	230
Une « dose-test » de la toxine OE ₃	150
Une « dose-test » de la toxine OE ₄	166
Une « dose-test » de la toxine OE ₅	120
Une « dose-test » de la toxine OE ₆	360
Une « dose-test » de la toxine OE ₇	212
Une « dose-test » de la toxine OE ₈	193
Une « dose-test » de la toxine OE ₉	183

Les titrages effectués par voie intraveineuse montrent qu'une « dose-test » des échantillons OE 2, OE 3, OE 4, OE 5, OE 6, représente 66 à 120 doses mortelles déterminées par voie veineuse.

2° VALEUR DE LA « DOSE-TEST » DÉTERMINÉE AVEC LE SÉRUM ÉTALON INTERNATIONAL. — Nous avons recherché avec le sérum étalon international (18) la valeur de la « dose-test » de deux échantillons de toxine *œdematiens* : OE et OE 2 ; après dilution convenable, nous l'avons utilisé, comme le sérum étalon français, à raison d'une unité antitoxique par souris. N'ayant pas à notre disposition des quantités suffisantes de ce sérum, nous n'avons pu effectuer les titrages à la fois par voie veineuse et par voie sous-cutanée. Nous avons uniquement réalisé des injections sous-cutanées.

Pour faciliter l'exposé, nous désignerons par « dose-test internationale » d'un échantillon de toxine la valeur précisée avec le sérum étalon international et par « dose-test française » la valeur obtenue avec le sérum étalon français.

Nous avons constaté que la « dose-test internationale » de la toxine OE est de 8 milligr. 8 et celle de la toxine OE 2, de

(18) Le sérum étalon international contient 20 unités antitoxiques par centimètre cube.

11 milligr. 9. Les résultats des titrages précédemment effectués avec le sérum étalon français ont montré que les « doses-test françaises » de ces deux toxines sont respectivement de 0,88 et 1 milligr. 45. De ces chiffres, il ressort que l'unité antitoxique du sérum étalon international neutralise dix fois plus de chacun des échantillons de toxine examinés que le sérum étalon français.

Ce fait étant établi pour deux échantillons de toxine, nous nous sommes demandé s'il était applicable à un plus grand nombre d'échantillons, autrement dit si l'unité internationale du sérum étalon anti-*œdematiens* neutralisait, d'une manière générale, dix fois plus de toxine que l'unité antitoxique du sérum étalon français. Tel pouvait ne pas être le cas.

Si nous nous reportons, en effet, aux résultats que nous avons obtenus (19) au cours de la détermination de la « dose-test » de plusieurs échantillons de toxine *perfringens* (E 11, P 24, P 25, E 19, E 31, E 40 par exemple), nous constatons les faits suivants : l'unité antitoxique du sérum étalon international anti-*perfringens* neutralise *trois fois plus* environ de toxine que l'unité antitoxique du sérum étalon français lorsqu'il s'agit des échantillons E 11 et P 24 ; elle ne neutralise que *deux fois plus* de toxine que l'unité antitoxique française dans le cas des toxines P 25 et E 19, et, enfin, elle ne possède que la *même valeur antitoxique* que cette dernière vis-à-vis des échantillons E 31 et E 40. En effet, la « dose-test internationale » de ces 6 échantillons de toxine est respectivement de : 3 milligr. 4, 1 milligr. 7, 1 milligr. 35, 2 milligr. 6, 1 milligr. 2, 1 milligr. 5 et la « dose-test française » de ces mêmes échantillons est respectivement de : 1 milligr. 1, 0 milligr. 65, 0 milligr. 7, 1 milligr. 1, 1 milligr. 2, 1 milligr. 5.

En présence de semblables observations, nous avons jugé utile de déterminer la valeur de la « dose-test internationale » de 6 nouveaux échantillons de toxine *œdematiens* déjà titrés avec le sérum étalon français. Les résultats de ces titrages sont groupés dans la dernière colonne du tableau II.

Avec le sérum étalon international, nous trouvons que la « dose-test » de la toxine OE 3 est de 3,1 ; celle de la

(19) *Revue d'Immunol.*, 5, 1939, p. 18 ; ces *Annales*, 66, 1941, p. 204.

toxine OE 4 : 12,8 et celle des toxines OE 7, OE 8, OE 9, OE 10 est respectivement de : 4 milligr. 8, 3 milligr. 3, 3 milligr. 8, 4 milligr. 6. En rapprochant ces valeurs de celles que l'on obtient avec le sérum étalon français, nous constatons que les valeurs déterminées avec le sérum étalon international sont dix fois plus fortes environ que les valeurs précisées avec le sérum étalon français.

De l'ensemble de ces résultats, on peut donc conclure, d'une part, que l'unité antitoxique anti-œdématisiens du sérum étalon international est dix fois plus grande que celle du sérum étalon français, et, d'autre part, que la « dose-test » d'un échantillon de toxine œdématisiens peut être recherchée uniquement avec notre sérum étalon puisque le rapport entre les valeurs des « doses-test » déterminées avec les deux sérums étalons est toujours du même ordre.

II. — TITRE ANTITOXIQUE DES SÉRUMS ANTI-ŒDEMATIENS

Pour déterminer le titre antitoxique d'un sérum anti-œdématisiens, nous avons pris comme dose d'épreuve d'un échantillon donné de toxine, soit 100 D.M.M., soit une « dose-test française » de cet échantillon afin de ne pas injecter aux souris des quantités trop élevées de toxine.

a) TITRAGES AVEC 100 DOSES MINIMA MORTELLES DE TOXINE.

Weinberg et Seguin ont évalué dès 1917 le pouvoir antitoxique des sérums anti-œdématisiens en recherchant le plus petit volume de sérum qui neutralise 100 D.M.M. de toxine (injections sous-cutanées à la souris). Ultérieurement, les collaborateurs de M. Weinberg ont adopté le même principe pour apprécier l'activité des sérums anti-œdématisiens. Lorsque nous l'avons nous-même appliqué, nous avons constaté que le titre d'un sérum, déterminé comparativement avec 100 D.M.M. de divers échantillons de toxine œdématisiens, peut varier beaucoup avec l'échantillon de toxine utilisé.

Ainsi le titre du sérum 122 est de 14.000, 9.500, 25.000 ou 12.000 à 14.000 unités suivant que le titrage est fait avec les

toxines OE 2, OE 3, OE 6 ou OE 9. Cette méthode d'évaluation du titre antitoxique des sérums anti-œdématisiens doit donc être abandonnée.

b) TITRAGES AVEC UNE « DOSE-TEST » DE TOXINE.

Borthwick a déterminé le titre antitoxique d'un sérum anti-œdématisiens vis-à-vis de 2 échantillons de toxine et conclu que la détermination du titre antitoxique d'un sérum anti-œdématisiens ne présente pas de difficultés lorsque le mélange de toxine et de sérum est injecté à la souris par voie intramusculaire ou mieux par voie intraveineuse, ou au cobaye par voie intracutanée.

Des résultats obtenus dans cinq laboratoires différents, chargés de titrer un sérum anti-œdématisiens avec une « dose-test » d'un échantillon donné de toxine ou avec tout autre échantillon, il ressort que le titre de ce sérum recherché au moyen de 4 échantillons de toxine œdématisiens préparés en Allemagne, en Angleterre, aux Etats-Unis ou au Danemark, est pratiquement indépendant de l'échantillon de toxine utilisé (titrage sur souris, injections intramusculaires).

Après les critiques formulées par H. W. Glotova contre la méthode des injections intramusculaires à la souris, nous avons déterminé comparativement par voie sous-cutanée et par voie veineuse le titre antitoxique de 4 sérums vis-à-vis de 6 toxines : OE, OE 2, OE 3, OE 4, OE 5, OE 6. La « dose-test française » de ces échantillons est respectivement de : 0 milligr. 88, 1 milligr. 15, 0 milligr. 31, 1 milligr. 25, 1 milligr. 2, 0 milligr. 36. Pour effectuer ces titrages, nous avons adopté notre procédé habituel de détermination du titre antitoxique d'un sérum antigangréneux quelconque, anti-*perfringens*, anti-vibron septique ou anti-histolytique : il consiste à préparer une série de mélanges contenant une quantité fixe d'un échantillon de toxine — une « dose-test » par souris — et des quantités variables du sérum à titrer ; les mélanges, amenés au même volume par addition d'eau physiologique, sont laissés pendant une heure à 37° avant d'être inoculés. Dans le cas du titrage des sérums anti-œdématisiens nous avons injecté, par dose de sérum essayé, au moins 8 souris de 17 à 20 grammes : la moitié sous la peau, l'autre moitié dans les veines. La durée d'observation des animaux a été de trois jours. Les chiffres obtenus au cours de ces recherches comparatives sont groupés dans le tableau III.

Ils attestent que les deux procédés d'injection appliqués au titrage d'un même sérum fournissent sensiblement les mêmes résultats. En effet :

Le sérum 113, éprouvé vis-à-vis d'une « dose-test française » de la toxine OE 3, titre 1.600 unités, que le dosage soit fait par voie veineuse ou par voie sous-cutanée. Le titre du sérum 483, vis-à-vis de la toxine OE 2, est de 4.000 unités par les deux procédés.

TABLEAU III. — Titres antitoxiques de 4 sérums anti-œdématisiens. Titrages effectués avec une « dose-test » de différents échantillons de toxine œdématisiens.

ÉCHANTILLON de toxine (numéro et dose-test)	SÉRUM 113		SÉRUM 122		SÉRUM 126		SÉRUM 483	
	Voie sous-cutanée	Voie veineuse	Voie sous-cutanée	Voie veineuse	Voie sous-cutanée	Voie veineuse	Voie sous-cutanée	Voie veineuse
OE ₁ (0,88)	2.000-2.200	2.000-2.200	6.000-6.500	6 500	800	750-800	5.000	4.000-4.500
OE ₂ (1,15)	1.700-1.800	1.700-1.800	6.000-6.500	6.000	700	700	4.000	4.000
OE ₃ (0,34)	1.600	1 600	6 000	6.000-6.500	750	750	3.500-4.000	4.000
OE ₄ (1,25)	2.000-2.200	2.000-2.200	6.500	6.500-7.000	800	850-900	4 500	4.500
OE ₅ (1,2)	1.800-2.000	1.800-2.000	8.000	8.000	800-850		5.000-6.000	5.000
OE ₆ (0,36)	1.800-2.000	1.800-2.000	7.000	6.500-7.000	650-700		4 000	4.000-5.000
OE ₇ (0,53)	1.700-1.800		7.000-8.000		650		3.500	
OE ₈ (0,28)	1.700-1.800		7.000-8.000		750		4 500	
OE ₉ (0,33)	1 700-1.800		7.000-8.000		750		4.000	

Les chiffres du tableau III indiquent que nous avons recherché, par la méthode des injections sous-cutanées à la souris, le titre d'un même sérum anti-œdématisiens non seulement vis-à-vis des 6 toxines OE, OE 2..., OE 6, mais aussi vis-à-vis des 3 autres échantillons : OE 7, OE 8, OE 9. Rappelons que les 4 premiers (OE, OE 2, OE 3, OE 4) ont été préparés avec notre souche habituelle de *B. œdématisiens* aussitôt après qu'elle avait été soumise à 2 passages sur cobyes et les 5 derniers, OE 5, OE 6..., OE 9, à partir d'un exemplaire de cette souche n'ayant subi aucun repiquage depuis 1917.

Si nous comparons l'ensemble des chiffres du tableau III, nous constatons que *les résultats obtenus au cours de la déter-*

mination du titre antitoxique d'un même sérum, au moyen de nos divers échantillons de toxine, sont souvent égaux : ainsi les titres trouvés par voie sous-cutanée pour le sérum 122 vis-à-vis de chacune des toxines OE, OE 2, OE 3 sont particulièrement concordants. De même les résultats du titrage du sérum 113 vis-à-vis des toxines OE 7, OE 8, OE 9.

Mais cependant des écarts de 12 à 25 p. 100 et parfois de 30 p. 100 ont été enregistrés dans quelques titrages. Les résultats des injections sous-cutanées montrent que le sérum 126, par exemple, titre 800 unités lorsque le dosage est pratiqué avec les toxines OE ou OE 4 et seulement 650 unités vis-à-vis de l'échantillon OE 7 ; le sérum 113, d'après les résultats des titrages effectués avec les toxines OE et OE 4 contient entre 2.000 et 2.200 unités et seulement 1.600 unités lorsque le titrage est réalisé avec la toxine OE 3 ; le sérum 483 titre 5.000 unités ou 3.500 suivant que le titrage est fait avec les toxines OE ou OE 7.

En résumé, les déterminations du titre antitoxique d'un sérum anti-*œdematiens*, effectuées avec une « dose-test » de divers échantillons de toxine homologue et par le procédé des injections sous-cutanées ou intraveineuses à la souris, fournissent des résultats qui ne diffèrent généralement que de 10 p. 100 ; parfois cependant les chiffres obtenus présentent des écarts de 20 à 30 p. 100.

DEUXIÈME PARTIE

ÉTUDE COMPARÉE

DES MÉTHODES EMPLOYÉES DANS DIFFÉRENTS PAYS POUR DÉTERMINER LA « DOSE-TEST » DES TOXINES *PERFRINGENS*, VIBRION SEPTIQUE, HISTOLYTIQUE ET *OEDEMATIENS*

TITRAGE DES ANTITOXINES CORRESPONDANTES

Au cours de nos recherches sur la toxine du *B. perfringens* type A nous avons fréquemment observé des discordances importantes entre les valeurs de la « dose-test » d'un même

échantillon de toxine *perfringens* titré comparativement avec 2 sérums étalons et insisté sur la diversité de constitution des sérums anti-*perfringens*.

Par contre, nous avons obtenu des résultats pratiquement concordants lorsque nous avons déterminé comparativement avec le sérum étalon international anti-vibron septique et avec le sérum étalon français la valeur de la « dose-test » de nombreux échantillons de toxine vibron septique (20).

Nous avons indiqué (21) les résultats très constants auxquels aboutissent les titrages des toxines histolytiques effectués comparativement avec les sérums étalons internationaux et français. Nous avons montré ensuite que le titrage de la toxine *œdematiens* ne présente pas de difficultés lorsque les injections sont effectuées par voie veineuse ou par voie sous-cutanée.

Dans le tableau IV, nous précisons :

1° Les quantités de sérum qui sont habituellement employées dans différents pays pour déterminer la « dose-test » d'une toxine et la dose invariable de sérum étalon que nous avons utilisée au cours de tous nos titrages ; 2° la voie d'injection adoptée ; 3° la valeur moyenne de la « dose-test » de nos échantillons de toxine.

De ce tableau il ressort que :

a) Dans les titrages successivement effectués à Copenhague avec les sérums étalons internationaux anti-*perfringens*, anti-vibron septique, anti-histolytique et anti-*œdematiens*, on a employé 1/5 d'unité antitoxique ou 1/2 unité antitoxique pour titrer la toxine *perfringens*, 1 unité ou 1/2 antitoxique dans le cas du titrage des toxines vibron septique ou histolytique, 1/50 d'unité dans le cas de la toxine du *B. œdematiens*.

b) A Moscou on emploie les sérums étalons soviétiques (22), et, pour titrer chacune des 4 toxines envisagées, on utilise 1/5 d'unité antitoxique du sérum étalon correspondant.

c) Dans nos titrages, la quantité d'antitoxine présente dans le mélange injecté à chaque souris est toujours de 1 unité quelle que soit la toxine correspondante à titrer.

(20) GUILLAUMIE (M.). Ces *Annales*, 67, 1941, p. 142.

(21) GUILLAUMIE (M.). Ces *Annales*, 66, 1941, p. 389.

(22) GLOTOVA (H. W.). Ces *Annales*, 59, 1937, p. 526.

TABLEAU IV. — Détermination de la « dose-test » d'une toxine *perfringens*, vibron septique, histolytique ou *œdematiens* (titrages sur souris).

LIEU DU TITRAGE	NATURE de la toxine à titrer	COMPOSITION DU MÉLANGE INJECTÉ A CHAQUE SOURIS			VOIE d'injection	VALEUR moyenne de la dose-test (milligr.)	
		Sérum étalon homologue convenablement dilué (c. c.)	Toxine diluée et eau physiologique (c. c.)	Volume total (c. c.)			
Copenhague	<i>Perfringens</i> . Vibron septique. Histolytique. <i>Œdematiens</i> .	0,2 = 1/5 ou 1/2 U. A. (1).	0,3	0,5	Veines.	Veines. Veines. Veines. Veines.	
		0,2 = 1 U. A. ou 1/2 U. A.	0,3	0,5	Veines.		
		0,2 = 1 U. A. ou 1/2 U. A.	0,3	0,5	Veines.		
		0,2 = 1/50 U. A.	0,3	0,5	Veines.		
Moscou	<i>Perfringens</i> . Vibron septique Histolytique. <i>Œdematiens</i> .	0,2 = 1/5 unité soviétique.	0,3	0,5	Veines.	Veines. Veines. Veines. Veines.	
		0,2 = 1,5 unité soviétique.	0,3	0,5	Veines.		
		0,2 = 1/5 unité soviétique.	0,3	0,5	Veines.		
		0,2 = 1/3 unité soviétique	0,3	0,5	Veines.		
Paris	<i>Perfringens</i> . Vibron septique. Histolytique. <i>Œdematiens</i> .	0,2 = 1 U. A.	0,3	0,5	Veines.	Veines. Veines. Veines. Veines ou sous la peau.	1,9
		0,2 = 4 U. A.	0,3	0,5	Veines.		2,7
		0,2 = 1 U. A.	0,3	0,5	Veines.		1,92
		0,2 = 1 unité française (2).	0,3	0,5	Veines		0,67

(1) U. A., unité antitoxique internationale.
(2) L'unité antitoxique française du sérum étalon anti-*œdematiens* est dix fois plus faible que l'unité internationale.

(1) U. A., unité antitoxique internationale.

(2) L'unité antitoxique française du sérum étalon anti-*œdematiens* est dix fois plus faible que l'unité internationale.

Nous avons institué ce mode uniforme de titrage après avoir pris en considération, d'une part, les valeurs de la D.M.M. et, d'autre part, celles de la « dose-test » de nos divers échantillons de toxine.

La valeur moyenne de la D.M.M. de nos échantillons de toxine *perfringens* étant de 0 milligr. 08 (moyenne de 58 préparations), nous n'avons pas cru devoir appliquer, au début de nos recherches, le procédé du titrage de cette toxine vis-à-vis de $\frac{1}{5}$ d'unité antitoxique, d'après le principe proposé en 1934. Par la suite, nous avons jugé nécessaire de toujours utiliser 1 unité antitoxique de sérum étalon pour déterminer avec une précision suffisante la « dose-test » de tous nos échantillons de toxine *perfringens*, car la valeur moyenne de leur « dose-test » est de 1 milligr. 9 (moyenne de 34 déterminations faites avec le sérum international).

La D.M.M., moyenne de nos échantillons de toxine vibron septique est de 0 milligr. 07 (moyenne de 14 préparations) ; celle de nos échantillons de toxine histolytique est de 0 milligr. 03 (moyenne de 15 préparations). Nous avons montré antérieurement que l'on peut utiliser indifféremment 1 unité antitoxique du sérum étalon international correspondant ou du sérum étalon français pour déterminer avec précision la « dose-test » de ces échantillons.

La « dose-test » de nos échantillons de toxine *œdematiens* est de 6 milligr. 6 (moyenne de 8 préparations) lorsqu'elle est précisée au moyen d'une unité antitoxique du sérum étalon international. La quantité de toxine injectée aux souris au cours de ces titrages est donc très grande. Pour éviter cet inconvénient on pourrait utiliser, pour titrer ces toxines, soit $\frac{1}{10}$ d'unité antitoxique du sérum étalon international, soit 1 unité antitoxique d'un sérum étalon français dont l'unité antitoxique choisie serait dix fois plus faible que l'unité internationale. Nous avons adopté ce dernier procédé pour que nos diverses toxines (*perfringens*, vibron septique, histolytique, *œdematiens*) et, ultérieurement, les immunsérums correspondants soient titrés d'une manière uniforme.

Dans le tableau V nous notons quelques-unes des dilutions que nous préparons pour rechercher le titre antitoxique d'un sérum quelconque : anti-*perfringens*, anti-vibron septique,

TABLEAU V. — Détermination du titre antitoxique d'un sérum anti-*perfringens* A, anti-vibrien septique, anti-histolytique ou anti-*œdematiens* (titrages sur souris).

TITRE antitoxique essayé	COMPOSITION DES MÉLANGES pour 10 souris				DOSE INJECTÉE à chaque souris : 0 c. c. 5	
	Toxine solution à 5 « doses-test » par centimètre cube] (c. c.)	Sérum [dilutions variables] (c. c.)	Eau physiologique (c. c.)	Volume total (c. c.)	Toxine	Sérum (c. c.)
200 U. A. (1)	2	1 à 1 p. 20	2	5	1 dose-test.	1/200
300 U. A. . .	2	1 à 1 p. 30	2	5	1 dose-test.	1/300
400 U. A. . .	2	0,5 à 1 p. 20	2,5	5	1 dose-test.	1/400
500 U. A. . .	2	1 à 1 p. 50	2	5	1 dose-test.	1/500
600 U. A. . .	2	0,5 à 1 p. 30	2,5	5	1 dose-test.	1/600
4.000 u. f. (2)	2	1 à 1 p. 400	2	5	1 dose-test.	1/4.000
4.500 u. f. . .	2	1 à 1 p. 450	2	5	1 dose-test.	1/4.500
5.000 u. f. . .	2	1 à 1 p. 500	2	5	1 dose-test.	1/5.000
6.000 u. f. . .	2	1 à 1 p. 600	2	5	1 dose-test.	1/6.000

(1) U. A., unité antitoxique internationale.
(2) u. f., unité antitoxique française.

anti-histolytique ou anti-*œdematiens*. Nous titrons actuellement tous ces sérums suivant le même principe : chaque souris reçoit, sous le volume de 0 c. c. 5 et en injection intra-veineuse, une quantité connue du sérum à titrer et une « dose-test » de la toxine homologue (23) en solution dans l'eau physiologique. Le nombre de souris injectées pour chaque

(23) Avant que le principe du titrage des toxines au moyen d'un sérum étalon soit couramment appliqué au laboratoire, le titre des sérums était déterminé de la façon suivante : on ajoutait à un volume déterminé du sérum à titrer, un nombre fixe de doses mortelles de la toxine correspondante (20 dans le cas des toxines *perfringens*, vibrien septique ou histolytique, 100 dans le cas de la toxine *œdematiens*). Les divergences que nous avons observées en recherchant, dans ces conditions, le titre d'un même sérum vis-à-vis de plusieurs échantillons de toxine homologue, ont nettement montré l'imprécision de cette méthode. *C. R. de la Soc. de Biol.*, 123, 1936, p. 513 ; *Id.*, 127, 1938, p. 1084.

dose de sérum essayée est de 4 à 8 ; la dose qui protège 50 p. 100 environ des souris inoculées indique, en unités antitoxiques internationales, le titre des sérums anti-*perfringens*, anti-vibron septique, anti-histolytique et, en unités antitoxiques françaises, le titre des sérums anti-*œdematiens*. Il suffit de diviser par 40 le titre français des sérums anti-*œdematiens* pour obtenir leur titre en unités internationales.

H. M. Glotova, en comparant les sérums étalons soviétiques aux sérums internationaux dans le but de déterminer les coefficients qui permettent de calculer en unités internationales la valeur antitoxique des sérums exprimée en unités soviétiques, a constaté qu'il faut multiplier par 2,5 le titre soviétique des sérums anti-vibron septique, par 5 celui des sérums anti-histolytique et diviser par 3,5 celui des sérums anti-*œdematiens*, pour convertir en unités internationales les titres soviétiques de ces sérums.

Pour résumer les caractéristiques de notre technique actuelle de préparation des toxines utilisées au cours de ces titrages, nous indiquons dans le tableau VI la quantité de glucose

TABLEAU VI. — Préparation des toxines *perfringens*, vibron septique, histolytique et *œdematiens* dans le bouillon Vf de bœuf.

	<i>Perfringens</i>	VIBRON septique	HISTOLYTIQUE	OEDEMATIENS
Souches.	<i>Lechien.</i>	<i>Feun/œun.</i>	<i>Lelivi.</i>	<i>Delombe.</i>
Glucose (grammes par litre).	4	5	0	0
pH avant stérilisation.	7,7-7,8	7,7-7,8	7,6	7,9-7,95
pH après stérilisation.	7,6-7,7	7,55-7,65	7,55-7,65	7,7-7,9
Température (degrés).	30-33	37	37	37
Durée d'incubation.	20-22 heures.	20-22 heures.	22 heures.	4-5 jours.
Nombre de D. M. M. par centimètre cube	25-50	150-350	100-300	4.000-12.000
Poids de toxine précipitée (grammes par litre)	0,725-3,375	7,650-18,250	0,360-6,875	2,420-11,500
D. M. M. moyenne de la toxine précipitée (milligramme).	0,08	0,07	0,03	0,004

ajoutée au bouillon VI ensemencé, la température et la durée d'incubation, ainsi que le titre de la toxine liquide, le poids de toxine précipitée par le sulfate d'ammonium, la valeur moyenne de la D. M. M. de la toxine précipitée. Rappelons que tous ces échantillons de toxine précipitée ont été préparés dans du bouillon Vf de bœuf. Jusqu'à présent les toxines

que nous avons obtenues dans divers bouillons additionnés de sang desséché ou de quantités variables de peptones commerciales (24) ont été employées uniquement à l'état liquide pour l'immunisation des chevaux, telles quelles ou après addition de formol.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS

PRÉPARATION ET TITRAGE DE LA TOXINE *œdematiens*.

Les différentes préparations de toxine *œdematiens* effectuées dans du bouillon Vf de bœuf ou de cheval ajusté à pH 7,7 ou 7,9 contiennent fréquemment 6.000 à 12.000 doses mortelles par centimètre cube (titrages après quatre à cinq jours d'étuve à 37°, sur souris de 17 à 20 grammes, injections sous-cutanées).

Le pH des toxines filtrées après cinq jours d'étuve varie entre 7 et 7,5.

Le foie cru ou cuit, le sang desséché de cheval ne favorisent pas l'élaboration de la toxine dans ce bouillon ; les peptones Riedel ou Defresne n'améliorent pas d'une manière constante sa valeur nutritive.

Le sulfate d'ammonium précipite en moyenne 6 grammes de toxine *œdematiens* par litre de toxine filtrée après cinq jours d'étuve, soit 36,7 p. 100 de la toxine présente dans le filtrat.

La D.M.M. moyenne des 13 échantillons que nous avons titrés par voie sous-cutanée est de 0 milligr. 0038 (tableau I).

(24) Le bouillon Vf de cheval, glucosé à 1 p. 1.000 et additionné de 1,5 p. 1.000 de sang desséché ou de 1 p. 100 de peptone (peptone Poulenc sans indol, peptone Defresne ou peptones 5 B ou 5 C des laboratoires Vaillant), est particulièrement favorable à pH 7,65 à la préparation de la toxine *perfringens*. Ensemencé avec notre souche habituelle de *B. perfringens* il nous a permis, en effet, de préparer une série de toxines contenant 35 à 70 D.M. par centimètre cube après vingt-deux heures d'étuve à 33°.

DÉTERMINATION DE LA « DOSE-TEST »
DE LA TOXINE *œdematiens*.

a) TITRAGES AVEC LE SÉRUM ÉTALON FRANÇAIS. — La détermination de la « dose-test » d'une toxine *œdematiens* est réalisée avec une aussi grande précision par la méthode des injections sous-cutanées à la souris que par celle des injections intraveineuses au même animal.

Les valeurs de la « dose-test » de nos divers échantillons de toxine *œdematiens* varient entre 0,35 et 1,25 ; elles représentent un nombre de doses mortelles généralement compris entre 100 et 230 (injections sous-cutanées).

b) TITRAGES AVEC LE SÉRUM ÉTALON INTERNATIONAL. — En utilisant 2 sérums étalons pour préciser la « dose-test » de 8 échantillons de toxine *œdematiens*, nous avons constaté que les valeurs déterminées avec l'étalon international sont dix fois plus fortes environ que les valeurs précisées avec l'étalon français. L'unité antitoxique du sérum étalon international est donc dix fois plus grande que celle du sérum étalon français. Le rapport entre les valeurs de la « dose-test » déterminée comparativement avec les 2 sérums étant toujours du même ordre, nous pourrions dorénavant utiliser l'un ou l'autre pour titrer une toxine *œdematiens*.

TITRE ANTITOXIQUE DES SÉRUMS ANTI-*œdematiens*.

Les résultats du titrage d'un sérum anti-*œdematiens* avec une « dose-test » de divers échantillons de toxine *œdematiens* ne diffèrent généralement que de 10 p. 100, mais parfois de 20 et 30 p. 100.

COMPARAISON DES RÉSULTATS DU TITRAGE DES SÉRUMS ANTI-*perfringens*, ANTI-VIBRION SEPTIQUE, ANTI-HISTOLYTIQUE ET ANTI-*œdematiens*.

Les titrages que nous avons effectués par la méthode des injections intraveineuses à la souris pour préciser au moyen de divers sérums étalons la valeur de la « dose-test » de nombreux échantillons de toxine *perfringens*, vibrion septique et

histolytique ont établi que dans le cas de toxine *perfringens*, les résultats des dosages réalisés avec le sérum étalon international ne concordent pas toujours avec ceux que l'on obtient avec le sérum étalon français ; par de nombreux exemples nous avons montré que les toxines vibron septique et histolytique peuvent, par contre, être indifféremment titrées avec le sérum étalon international ou avec le sérum étalon français homologue. En appliquant ensuite un procédé uniforme pour déterminer vis-à-vis d'une « dose-test internationale » de plusieurs échantillons de toxine *perfringens*, vibron septique ou histolytique le titre antitoxique des immunsérums correspondants, nous avons constaté que les divers sérums ne sont pas titrés avec la même précision. Tandis que les résultats du titrage d'un même sérum anti-*perfringens* peuvent fréquemment présenter, suivant l'échantillon de toxine homologue utilisé, des divergences de 40 à 80 p. 100 (25) les discordances les plus grandes que nous ayons notées au cours du titrage d'un même sérum anti-vibron septique ou anti-histolytique sont respectivement de 25 et 16 p. 100. Les données ci-dessus indiquent que nous avons quelquefois observé des écarts de 30 p. 100 entre les résultats du titrage d'un même sérum anti-*oedematiens*. De cette étude il ressort donc que les immunsérums examinés, classés par ordre de précision croissante des titrages, se rangent dans l'ordre suivant : sérums anti-*perfringens*, anti-*oedematiens*, anti-vibron septique, anti-histolytique.

(25) Ce mémoire était imprimé lorsque les publications de J. Ipsen sur le titrage de l'antitoxine *perfringens* me sont parvenues. Avec R. Davoli, J. Ipsen a aussi observé des écarts de 80 p. 100 entre les valeurs antitoxiques attribuées à un même sérum titré avec différents échantillons de toxine *perfringens* préparés avec la souche Lechien (*Bull. de l'Organ. d'Hyg. de la Soc. des Nat.*, 1939, vol. VIII, p. 906). D'après les chiffres publiés ultérieurement par J. Ipsen (p. 923 du même bulletin), les résultats des titrages effectués avec 10 échantillons de toxine très faiblement hémolytique de la souche S. S. présentent entre eux des écarts maxima de 30 p. 100.

Dans mes recherches, j'ai toujours utilisé la souche Lechien pour obtenir les nombreux échantillons de toxine qui m'ont servi au cours du titrage des sérums anti-*perfringens* (*C. R. Soc. Biol.*, **123**, 1936, p. 661 ; **126**, 1937, p. 656 ; **127**, 1938, p. 1084 ; *C. R. Acad. des Sc.*, **234**, 1937, p. 1012 ; *Rev. d'Immun.*, **5**, 1939, p. 5 ; ces *Annales*, **66**, 1941, p. 204.

LE VANADIUM COMME ÉLÉMENT OLIGOSYNERGIQUE POUR L'*ASPERGILLUS NIGER*

par DIDIER BERTRAND.

(Laboratoire de Chimie biologique de l'Institut Pasteur.)

Sachant que le vanadium existe normalement chez les végétaux à des concentrations extrêmement faibles [1], il importe de savoir si cet élément est indispensable à la vie des organismes ou s'il se rencontre seulement chez ceux-ci à l'état d'impureté inerte adsorbée à partir du sol. Divers auteurs s'étaient déjà demandé, pour des raisons diverses, si le vanadium jouait un rôle physiologique dans la vie végétale. Toutefois, ignorant totalement les quantités de ce métal existant chez les végétaux et ne sachant même pas si sa présence y était normale, leurs points de vue ne pouvaient être qu'assez arbitraires ; aussi, la plupart des recherches ont-elles été effectuées dans un but toxicologique. Le vanadium existe en effet dans certains engrais en quantité non négligeable, en particulier dans les scories Thomas. Quoiqu'un tel point de vue soit nettement différent de celui qui nous occupe, il m'a paru nécessaire de citer les travaux relatifs à l'action physiologique du vanadium chez les végétaux.

D'après les résultats de Bokorny [2], Frouin et M^{lle} Ledebt [3], Frouin et Mercier [4], Javillier [5], on peut conclure que le vanadium n'est presque pas toxique pour certains micro-organismes et qu'il peut même, à des concentrations assez fortes (1/5.000), avoir une action favorable.

Suivant Burk et Horner [6], puis Bortels [7], le vanadium produirait une stimulation du développement de l'*Azotobacter* à des concentrations qui sont de l'ordre de celles que ces microorganismes peuvent, d'après mes propres recherches, rencontrer dans la nature.

Par contre, en ce qui concerne les végétaux supérieurs,

d'après Suzuki [8], Ramirez [9], Krioukov [10], Brenchky et Winifried [11], Scharrer et Schropp [12], Shibuya et Parki [13], le vanadium serait soit sans action, soit toxique. Ces faits peuvent s'interpréter grâce à la loi de l'optimum de concentration nutritive de Gabriel Bertrand [14], aucun des auteurs cités ne s'étant préoccupé de connaître les quantités de vanadium restant dans leurs milieux de culture ; comme les végétaux ne contiennent que très peu de vanadium, on est en droit de penser, par analogie avec les autres éléments déjà étudiés chez les plantes, que celles-ci n'ont que des besoins extrêmement faibles en ce métal et il est vraisemblable que les savants ayant étudié l'action physiologique du vanadium sur les végétaux ont, sans le savoir, dépassé la concentration optima.

Il y a lieu de noter que Gericke et Rennenkampff [15] trouvent une action favorable, pour des concentrations pourtant assez grandes, dans le cas de l'orge déjà étudié par Suzuki [8], Brenchky et Winifried [11], Scharrer et Schropp [12].

RECHERCHES PERSONNELLES

INTRODUCTION.

Je me suis adressé à l'*Aspergillus niger*.

Il ne peut y avoir aucune espèce d'ambiguïté sur le végétal étudié et je lui conserverai l'appellation d'*Aspergillus niger*, comme l'ont fait presque tous ceux qui, depuis Raulin, ont étudié ce champignon. Cette dénomination n'est, en réalité, pas exacte. C'est Van Tieghem qui, le premier, a décrit ce cryptogame (*Ann. Soc. Nat.*, 3^e série, 8, 1867, p. 210). Il lui a donné le nom d'*Aspergillus niger* et spécifié que « c'est bien de ce végétal qu'il s'agit dans les recherches chimiques que poursuit son ami Raulin » mais, quelques années plus tard (*Bull. de la Soc. Bot. de France*, 24, 1877, p. 102), il reconnut que ce n'est pas un *Aspergillus*, mais un *Sterigmatocystis*, genre créé en 1859 par Cramer pour un seul champignon, aussi lui donne-t-il désormais, dit-il, le nom de *Sterigmato-*

cystis nigra, désignation qui doit être suivie de la mention : Cramer-Van Tieghem.

Cette plante est très pauvre en vanadium, puisque l'échantillon analysé n'en renfermait que 0 milligr. 152 par kilogramme sec. Cet échantillon provenait de la culture faite sur milieu de Raulin, avec des sels commerciaux non purifiés. La plante était normale d'aspect et son poids sec relatif à 2 litres de milieu de culture différait peu de celui que Raulin indique, dans sa thèse, comme le poids maximum que l'on puisse obtenir. Les conditions expérimentales étant celles indiquées par Raulin, on peut considérer que le chiffre de vanadium trouvé correspond à une quantité de ce métal suffisant à la croissance normale du végétal envisagé. S'attendant donc à de grandes difficultés pour purifier suffisamment les milieux de culture, on peut d'autant plus se demander si le choix du matériel est approprié, que l'*Aspergillus niger* n'est pas un végétal ayant eu, jusqu'ici, des applications utiles.

Si une telle considération peut servir à orienter certaines recherches, il ne faut pas perdre de vue que la science appliquée utilise toujours les résultats de la science théorique. La pensée que Pasteur [46] exprimait en 1862, à propos de ses découvertes sur la génération des êtres inférieurs, si elle n'est plus applicable à la lettre, n'en reste pas moins profondément vraie dans son esprit.

D'autre part, le 4 février 1869, Pasteur écrivait à Raulin, à propos du travail de ce dernier intitulé : « Etudes chimiques sur la végétation » :

« C'est assez pour moi que l'on sache que ce travail a été commencé dans mon laboratoire et qu'il est dans la direction d'études sur laquelle j'ai le premier peut-être appelé l'attention en faisant entrevoir leur fécondité et leur avenir. Je n'avais donné que des espérances. Vous nous apportez de fort belles et fort curieuses réalités. »

En partant de considérations très différentes, la constitution et le mode d'action de la laccase, Gabriel Bertrand [47] a été amené à reprendre à un certain point de vue les recherches de Raulin et leur a donné une portée plus générale et un sens nouveau en montrant que le manganèse était un élément indispensable à la vie de ces végétaux. Raulin [48], qui avait

essayé ce métal, ne lui avait pas trouvé d'effet favorable. Gabriel Bertrand a montré [17], comme nous l'avons déjà dit, que cela était dû à ce que le milieu de culture utilisé par Raulin contenait déjà suffisamment de manganèse pour subvenir aux besoins de la plante. En purifiant suffisamment le milieu de culture, il a pu montrer ainsi que 1/10.000.000.000 de ce métal suffisait déjà pour produire un très fort accroissement de la récolte de l'*Aspergillus niger*. Comme, d'autre part, cette plante n'est pas très sensible à une action toxique du manganèse lorsqu'on l'emploie en grandes quantités, on s'explique très bien que le manganèse existant déjà dans les sels utilisés par l'élève de Pasteur se soit trouvé en quantité supérieure à l'optimum de ce qui était nécessaire. Raulin n'avait pas pu lui trouver une action physiologique marquée, soit favorable, soit défavorable, mais contrairement à ce que pensent beaucoup d'auteurs il avait déjà très explicitement exprimé l'idée que des éléments autres que ceux pour lesquels il avait trouvé une action favorable soient pourtant indispensables à la vie de l'*Aspergillus niger* (Thèse, p. 169, 178 et 210). C'est par suite de la difficulté analytique qu'il fallut attendre quarante-deux ans pour que la démonstration de cette vue prophétique puisse être donnée (tout au moins en ce qui concerne le manganèse). Depuis cette démonstration, de nombreux auteurs se sont attachés à la question, mais jusqu'ici, seul le cuivre peut être ajouté à la liste des éléments reconnus indispensables à la vie de l'*Aspergillus niger*. Il faut tout de même signaler que le molybdène et le gallium ont été ajoutés à cette liste par Steinberg [19], mais jusqu'à présent les travaux de ce dernier auteur n'ont été ni confirmés ni infirmés.

CONDITIONS EXPÉRIMENTALES DE LA CULTURE.

Raulin faisait ses cultures dans des cuvettes plates, en porcelaine. Ces cuvettes n'étaient pas recouvertes. Des études ultérieures ont montré qu'il était préférable d'opérer dans des conditions stériles, parce que les cultures peuvent se trouver envahies par des infusoires et d'autres microorganismes ; aussi ai-je opéré dans des fioles couvertes de papier filtre. Une stérilisation grossière, que l'expérience a montrée

suffisante, a été obtenue par l'ébullition du milieu de culture dans les fioles mêmes, avant l'ensemencement.

Ce dernier a été fait très largement avec un fil de platine. En outre, le récipient est vigoureusement agité, de façon à bien disperser les spores sur la surface du liquide. Cette condition est indispensable pour obtenir des résultats constants et bien comparables entre eux.

La température joue un rôle très important ; elle est une

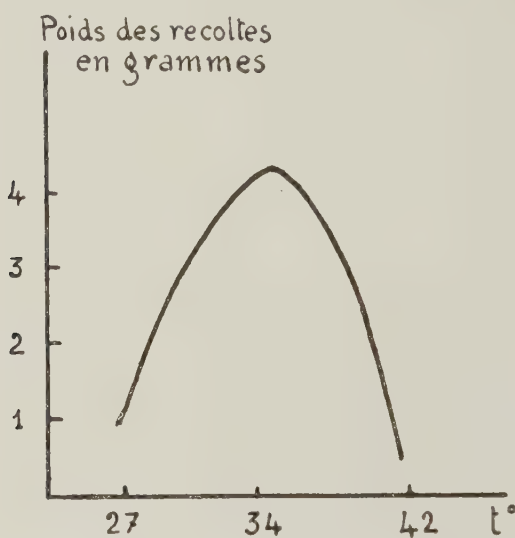


FIG. 1.

cause de variations importantes. Il est extrêmement difficile d'obtenir une température homogène dans les étuves dans lesquelles ont lieu ordinairement les cultures. Raulin n'avait pas réussi à avoir des poids constants, à moins de 10 p. 100 près, toutes conditions restant identiques.

Le choix de la température peut être fait d'après Raulin ; pour un milieu donné, cet auteur a obtenu le résultat suivant, que j'ai mis sous forme graphique (fig. 1).

Ce graphique nous montre que la température exerce une action optima aux environs de 34°-35°. Pour cette température, la variation de poids pour une variation de 1° est

minima ; mais ceci n'est valable que dans les conditions opératoires de Raulin, et pour la comparaison de divers lots de cultures entre eux.

Le thermostat que j'ai utilisé pour avoir une température homogène était constitué par une chambre thermostatique dont la stabilité de température est, en temps normal, très satisfaisante. Malheureusement, dans les circonstances actuelles, les bâtiments étant mal chauffés et les variations de température extérieures assez grandes cet hiver (1940-1941), la chambre thermostatique a subi des variations de 1° à 2° au cours des expériences. Généralement, ces variations n'ont que peu d'importance lorsqu'on compare entre eux les poids d'un même lot. Malgré ces variations, en effet, la température est restée assez homogène pour le volume assez petit dans lequel se trouvaient les récipients de culture. De plus, pour diminuer les erreurs dues aux variations locales de température, les récipients contenant les cultures témoins et les cultures avec vanadium étaient mélangés entre eux.

La nature des récipients intervient également parce que le milieu de culture dissout toujours un peu des constituants des récipients et, si ceux-ci renferment l'élément qu'on étudie, les expériences peuvent être fortement troublées. C'est ce qui a été démontré pour la première fois à propos du manganèse par Gabriel Bertrand [17]. Aussi, ai-je utilisé des fioles en Pyrex qui, comme nous l'avons vu dans la partie analytique de ce travail, ne contient que des quantités extrêmement petites de vanadium et est, d'autre part, très peu attaqué. Nous verrons d'ailleurs que ce verre contient encore trop de vanadium. Les récipients sont lavés avec de la soude à 30 p. 100, puis avec de l'eau régale bouillante, avec de l'eau distillée, enfin avec de l'eau redistillée.

Pour des raisons pratiques, chaque essai ne porte que sur 50 cent. cubes. Afin que le liquide nutritif ne soit pas répandu en couche trop mince ou trop épaisse (ce qui, comme l'a montré Raulin, change considérablement le poids des récoltes), j'ai utilisé des récipients de 125 cent. cubes, la couche de liquide est alors d'environ 1 cent. 7.

FORME SOUS LAQUELLE EST UTILISÉ LE VANADIUM.

Comme il n'est ajouté que très peu de sel, l'état de valence importe peu, puisque cet état dépend du potentiel d'oxydo-réduction du milieu. Le sel utilisé est le métavanadate d'ammonium, qu'il est facile d'avoir très pur. Les solutions aqueuses ne se conservant pas, il est nécessaire de les préparer juste avant l'emploi.

CHOIX DU PHÉNOMÈNE DESTINÉ A REPÉRER
L'ACTION DU VANADIUM.

Si le vanadium exerce une action physiologique quelconque sur *l'Aspergillus niger*, il y aura nécessairement variation de poids par rapport au témoin sans vanadium. En effet, ou bien cette action influe sur la composition élémentaire des éléments plastiques de la cellule végétale, ce qui, étant donné les faits connus jusqu'ici, est bien improbable pour les quantités de vanadium envisagées, et alors il faudrait un hasard bien extraordinaire pour retrouver le même poids que le témoin, ou bien il y a une relation entre le poids de matière végétale formée et la quantité de vanadium, ce qui suppose implicitement une variation de poids par rapport au témoin. Le poids de mycélium utilisé est le poids de matière sèche à 103° ; le poids frais était trop variable pour permettre des comparaisons. Certains auteurs, estimant que la variation de poids n'était pas un indice suffisant, ont utilisé le rapport entre le poids de végétal formé et le poids de l'aliment consommé (coefficient d'utilisation). Ils sont arrivés à la conclusion qu'entre de très larges limites, ce coefficient ne variait pratiquement pas. Un tel fait peut parfaitement s'expliquer en admettant qu'il n'y a pas, ou peu, de variations dans la composition élémentaire de *l'Aspergillus niger* lorsque les conditions de milieu varient. De l'un de ces travaux (E. F. Terroine et R. Wurmser [20], nous retiendrons, parce que ces résultats seront utilisés en ce qui nous concerne, que le coefficient d'utilisation, tel qu'il vient d'être défini, ne varie pratiquement pas pour des cultures faites entre 22° et 38°, pour un pH

de milieu de culture variant entre 7,7 et 1,7 (il y a abaissement des trois quarts pour un pH de 1,2), lorsque la nature de la source carbonée change, lorsque la nature de la source azotée change (en tenant compte de la variation d'énergie que représente le passage de l'azote de l'état d'ion ——— à celui d'ion + + + + +, ou aux passages intermédiaires). Ces conclusions me permettront, par extrapolation, d'étendre à un milieu quelconque les résultats obtenus pour un milieu de culture donné. Les nécessités analytiques de purification peuvent obliger, en effet, à utiliser des milieux de culture assez différents de celui de Raulin, ceci par suite de la difficulté de purifier tel ou tel produit, ou, au contraire, la facilité de purification d'un produit n'entrant pas dans la composition habituelle du milieu de Raulin. Mais, de toute façon, étant donné des conditions de culture, la seule différence qu'il y ait entre les milieux témoins et ceux où le vanadium est en expérience, réside précisément dans le fait qu'il y a du vanadium.

Si, dans ces conditions, il y a entre le poids sec des récoltes de l'*Aspergillus niger* provenant des milieux témoins et celui provenant des milieux additionnés de vanadium une différence de poids supérieure à celle que donnent les erreurs expérimentales, je dirai qu'il est démontré que le vanadium peut jouer un rôle physiologique dans la croissance de l'*Aspergillus niger*. Mais on ne peut dire que le vanadium joue normalement un rôle physiologique que si les quantités de métal en cause sont de l'ordre de celles rencontrées dans les conditions ordinaires de la nature par l'*Aspergillus niger*. La première partie de cette proposition a déjà été démontrée par Javillier. Je me suis proposé d'étudier la deuxième, c'est-à-dire de savoir si le vanadium joue dans le développement de l'*Aspergillus niger* un rôle physiologique normal ; s'il y remplit, comme l'appelle Gabriel Bertrand, le rôle d'un élément oligosynergique.

SOUÇHE UTILISÉE. — Il est nécessaire d'indiquer la souche employée parce que, ainsi que l'ont montré les expériences de Gabriel Bertrand sur le manganèse, celles de Javillier sur le zinc, celles de Wolff et Emmeric sur le cuivre, les souches

d'*Aspergillus* sont plus ou moins sensibles à l'action des métaux utilisés en faibles quantités. Cette différence d'action peut provenir d'une adaptation, mais, quoi qu'il en soit de ces différences, il ne faut pas oublier que, si un métal exerce une action nette vis-à-vis d'une souche, ce même métal possède également une action nette vis-à-vis de n'importe quelle autre souche. Celle que j'ai utilisée provient des collections de l'Institut Pasteur et porte le n° AN 315 (souche de collection conservée sur milieu gélosé et provenant originairement de noix de galle).

ETUDE EXPÉRIMENTALE DE L'ACTION DU VANADIUM.

Un premier point à élucider est celui de savoir si le vanadium n'est pas susceptible de remplacer un autre métal. Javillier [5] a déjà montré qu'il ne pouvait remplacer le zinc. Mulder [21] a montré incidemment qu'il ne pouvait remplacer le cuivre. Les expériences de Gabriel Bertrand semblent prouver implicitement qu'il ne peut remplacer le manganèse. Encore que ses propriétés chimiques ne permettent pas de le penser de façon certaine, on ne doit pas considérer qu'il remplace, dans la nature, le fer ou le magnésium, les quantités de ces métaux nécessaires à l'*Aspergillus niger* étant bien supérieures, en effet, à ce que ce champignon peut trouver de vanadium dans les milieux naturels. Il est cependant préférable de faire une vérification, tout au moins en ce qui concerne le fer, dont il est très difficile de le séparer analytiquement. J'ai donc fait l'expérience suivante :

Milieu de Raulin sans fer.

Quantités de vanadium ajoutées.	1,10- ⁵	3,10- ⁵	1,10- ⁶	2,10- ⁴	Témoin.
Poids sec des cultures, en milligr.	563	578	638	659	566

Le milieu avait été préparé avec des sels purs du commerce, mais n'avait pas été spécialement purifié pour éliminer tout le fer. Cette expérience montre, comme l'on pouvait s'y attendre, que le vanadium ne peut pas remplacer le fer et confirme, d'autre part, sa non-toxicité pour l'*Aspergillus niger*. L'action bienfaisante exercée ici ne semble pas due à

une impureté du sel de vanadium, l'analyse spectrographique de celui-ci ne m'ayant pas permis de déceler un autre élément que ce métal (pour une quantité de sel analysée s'élevant à 40 milligrammes).

Il importe de remarquer que, jusqu'ici, on ne connaît pas de cas où un métal ayant une action physiologique puisse être remplacé par un autre. Ainsi, le potassium et le sodium, qui sont pourtant si voisins au point de vue chimique, ne sont pas remplaçables l'un par l'autre dans la nature vivante. Toutefois, Javillier [5], recherchant si le zinc était remplaçable pour l'*Aspergillus niger*, a montré qu'en l'absence de zinc, le cadmium pouvait, dans une certaine mesure, jouer le rôle d'oligoélément pour ce champignon.

Un peu avant Javillier, Lepierre [22] avait montré, dans une publication portugaise peu répandue, cette action du cadmium et avait trouvé également que le glucinium pouvait favoriser la croissance de l'*Aspergillus niger*. Lepierre conclut entre autres : « Enfin, je dirai que je considère les substitutions du zinc par le cadmium, le glucinium et même le cuivre, comme une *démonstration biologique* (souligné dans le texte) intéressante de la loi périodique de Mendelejeff, que je crois être le premier à avoir énoncée et vérifiée. » Depuis, d'après certains auteurs dont Javillier, le Cu et le Gl ne pourraient remplacer le Zn. Sans vouloir rouvrir ici les discussions qui sortent du cadre de cette étude, je chercherai seulement si le vanadium joue un rôle physiologique ou s'il est un élément indifférent, ceci à des concentrations correspondant à celles de ce métal dans la nature et, en particulier, dans le milieu de Raulin non spécifiquement purifié pour en éliminer le vanadium.

Pour remplir ces conditions, j'ai toujours mis dans le milieu de culture, et dans la proportion voulue, l'ensemble des éléments dont l'utilité a été reconnue ou considérée comme certaine.

Le milieu contenait en conséquence du carbone, de l'hydrogène, de l'oxygène, de l'azote, du phosphore, du soufre, du potassium, du magnésium, du fer, du zinc, du manganèse, du cuivre, du molybdène, plus, évidemment, les impuretés que la purification faite n'avait pas enlevées. Or nous avons vu

que, suivant les circonstances, les propriétés chimiques du vanadium peuvent se rapprocher de celles de l'azote et, surtout, du phosphore, de l'arsenic, du chrome, du molybdène, du carbone, du fer et des métaux de la série magnésienne, soit : magnésium, zinc, cadmium, fer, cobalt, cuivre, manganèse ++ et nickel. Il s'ensuit nécessairement que si, dans ces conditions, le vanadium exerce une action physiologique nette pour de faibles concentrations, on devra considérer, d'après le travail de Lepierre, que ce métal ne peut être remplacé par un autre. Le milieu ne contient pas explicitement d'As, de Cr, de Cd, de Co et de Ni, mais, d'après le travail précité et la classification de Mendelejeff, si l'un de ces corps devait pouvoir remplacer, au moins qualitativement, le vanadium, il en serait de même de l'un au moins des suivants : N, P, Mo, Fe, C, Mg, Zn, Cu qui, tous, sont en quantité suffisante dans le milieu utilisé.

Nous avons déjà vu qu'un mycélium d'*Aspergillus* ayant poussé sur un milieu de Raulin constitué avec des sels non purifiés, ne contenait que 0 milligr. 152 de vanadium par kilogramme sec. La culture étant parfaitement normale, tant au point de vue de l'aspect que de celui du poids, nous sommes en droit de penser, comme je l'ai déjà fait observer, que le champignon a trouvé, dans le milieu de culture, suffisamment de vanadium pour ses besoins. L'analyse de ce milieu montre que, dans 1 litre, il y a 6,7 γ de vanadium, la majeure partie de ce métal provenant du sel de fer. Le poids correspondant de récolte étant de 18 grammes sec et ces 18 grammes ne renfermant que 2,5 γ de vanadium, une concentration de $6,7 \cdot 10^{-9}$ est plus que suffisante pour obtenir une culture normale. Une telle affirmation peut être faite par analogie avec ce qui se passe pour les autres métaux déjà étudiés. C'est ainsi que Gabriel Bertrand [17] a montré, pour le manganèse, que la plante est capable d'extraire pratiquement tout le métal renfermé dans le milieu lorsque la concentration de ce dernier est inférieure à celle correspondant aux besoins normaux du végétal.

De très nombreux essais [23] m'ayant prouvé la très grande difficulté qu'il y avait à purifier le milieu de Raulin, j'ai dû recourir à un milieu de culture plus simple où, comme dans

celui déjà utilisé avec succès pour montrer l'action du manganèse sur l'*Aspergillus niger* [17], la source de carbone est de l'acide succinique au lieu de saccharose et d'acide tartrique, ordinairement employés, mais trop difficiles à obtenir purs dans le cas du vanadium.

Toutes les souches d'*Aspergillus niger* ne s'accommodent pas de cette source de carbone. On peut les y habituer par des cultures contenant des proportions croissantes d'acide succinique et des proportions décroissantes de sucre. La souche dont je disposais pouvait croître dans un tel milieu, mais la culture avait un retard de quarante-huit à soixante-douze heures. Comme il ne s'agit là que d'un petit inconvénient, je n'ai pas voulu risquer d'en modifier trop profondément les caractères, de façon à pouvoir faire des comparaisons avec les cultures en milieu sucré.

Le milieu finalement utilisé avait la composition suivante :

Eau, q. s. pour.	1 litre.	Fer	200 γ
Acide succinique.	40 gr.	Zinc	180 γ
Chlorure d'ammonium. . .	2,5	Cuivre	40 γ
Phosphate bipotassique . .	0,350	Manganèse	20 γ
Sulfate de Mg (cristal) . . .	0,250	Molybdène	20 γ

(Ce milieu est dérivé d'un milieu utilisé par Steinberg [19]).

Des essais faits avec un tel milieu non purifié, ou mal purifié, m'ont montré que la culture était maximum vers le quatrième jour après son départ effectif, mais qu'après six à sept jours le poids variait d'abord peu, pour diminuer ensuite notablement. Les pH suivent assez bien les variations de poids.

Dans le but de purifier ce milieu au maximum, l'acide succinique a été recristallisé à trois reprises dans l'eau (redistillée dans le vide), acidifié par 5 p. 100 d'acide sulfurique pur (un dosage effectué sur une quantité d'acide sulfurique égale à celle employée, soit 60 grammes, n'a pas permis de trouver de vanadium), puis une fois dans l'eau redistillée seule. Dans l'ensemble des eaux-mères de cristallisation, je n'ai trouvé que 2 γ de vanadium. Le total de l'acide succinique ainsi traité était de 365 grammes. Ne disposant pas d'assez d'acide succinique, je n'ai pu en sacrifier suffisamment pour savoir s'il était encore possible d'y trouver du vanadium.

Le phosphate de potassium utilisé était un sel pur du commerce. L'analyse spectrographique n'a permis d'y trouver que des traces de magnésium et de sodium, plus une quantité appréciable de calcium. L'étude chimique, qui a porté sur 3 gr. 5, permet de dire qu'il contenait un peu de vanadium (sensiblement 8 γ).

Le sulfate de magnésium, également sel « pur » du commerce, contenait, d'après l'étude spectrographique, des traces de fer, de silicium, d'aluminium et de fortes traces de manganèse, de cuivre et de calcium. L'analyse chimique révèle, en outre, que 2 gr. 5 contiennent environ 7 γ de vanadium.

Le sulfate ferreux déjà étudié antérieurement contient 9,5 γ de vanadium pour 100 milligrammes, soit pour sensiblement 20 milligrammes de fer.

Le sulfate de zinc, qui a été recristallisé à plusieurs reprises dans de l'eau bidistillée, contient, d'après l'analyse spectrographique, de très faibles traces de Mg, de Si, d'Al et des traces plus importantes de Ca. L'analyse chimique ne permet pas d'y trouver le vanadium dans 400 milligrammes.

Les sels de Mn, de Cu et de Mo ont été étudiés ensemble et l'analyse chimique ne permet pas d'y déceler le vanadium dans une quantité correspondant à 20 litres de milieu de culture.

L'ammoniaque a été apportée sous forme de chlorure d'ammonium, obtenu directement à partir d'acide chlorhydrique et d'ammoniaque, ces derniers contenant respectivement moins de 0 milligr. 008 par litre pour de l'acide dix fois normal, et moins de 0 gr. 02 de vanadium par litre pour de l'ammoniaque dix fois normale, soit donc moins de 0 milligr. 05 de vanadium par kilogramme de chlorure d'ammonium.

Enfin, l'étude spectrographique du vanadate d'ammonium, ainsi qu'il a déjà été dit, n'a pas révélé d'autre élément que le vanadium, dans 10 milligrammes.

Il résulte de cette étude qu'en dehors du vanadium existant dans l'acide succinique (et qui, nécessairement, ne s'y trouve qu'en très faibles proportions), 1 litre de milieu de culture ne doit contenir que 1,6 γ de vanadium au plus.

Comme il reste encore trop de vanadium, le milieu est, avant l'addition de fer, zinc, cuivre, manganèse et molybdène,

purifié par le cupferron en suivant la technique utilisée pour le dosage du vanadium [24].

La purification a été faite en trois fractions, pour obtenir finalement 4 litres 5 de milieu de culture, dont 4 ont servi pour les témoins et 0,5 pour des cultures dans lesquelles la

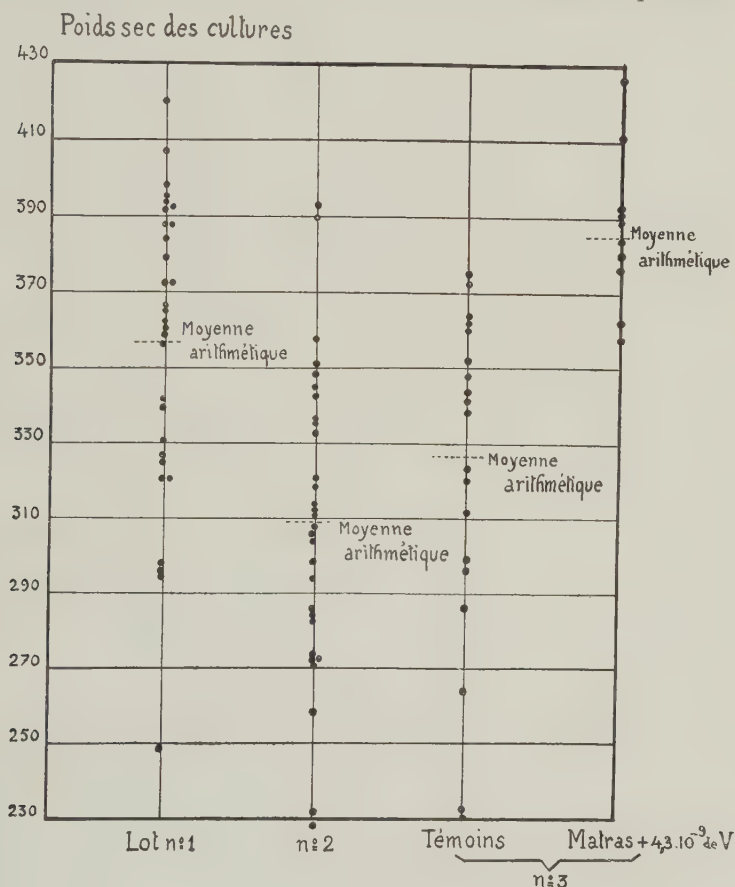


FIG. 2.

concentration de vanadium ajouté était de $4,3 \cdot 10^{-9}$. Lors de cette extraction, quoique la concentration saline du milieu fût inférieure à 5 p. 100, le milieu a été dilué de moitié, de façon à diminuer l'effet du sel. L'extraction a été faite à dix reprises, après addition de 20 cent. cubes d'une solution récente de cupferron à 10 p. 100, puis encore cinq fois après

addition de 3 cent. cubes de la solution de cupferron, et, à titre de contrôle, une fois, après une nouvelle addition de $1/2$ cent. cube.

En outre, au lieu de faire bouillir le liquide pour chasser le chloroforme restant, cette opération, qui avait lieu dans la verrerie Pyrex (comme toutes les autres), fut faite dans le vide, de façon à diminuer les risques d'attaque du récipient et, par conséquent, d'introduction du vanadium.

Les résidus d'extraction des 4 litres 5 ont été réunis et l'analyse chimique a montré qu'ils renfermaient 8 γ de vanadium. D'après le calcul que nous avons fait, il devait y en avoir 7,2 plus celui de l'acide succinique, qui devait être très faible. Il est donc permis de supposer que le milieu purifié contenait moins de 4.10^{-9} de vanadium.

RÉSULTAT. — Lot n° 1. 30 matras sans addition de vanadium. pH initial = 3,65 ; température, 33° ; durée de la culture, quatre jours et demi effectifs (départ après trois jours).

Le pH final est de 3,8. Dans aucun des matras les spores ne couvraient toute la surface du mycélium. Ce dernier a été lavé avec de l'eau redistillée avant d'être mis à sécher. Le poids sec moyen fut de 356 milligr. 6 ; + 16,7 p. 100 ; —36 p. 100.

Lot n° 2. Nombre de matras sans addition de vanadium : 30 ; pH initial = 4. Température, 32°. Durée de la culture, quatre jours effectifs (départ après trois jours). pH final = 4. Comme dans le lot n° 1, les spores ne couvrent pas toute la surface du mycélium, qui est également lavé avec de l'eau redistillée avant d'être mis à sécher. Le poids moyen sec fut de 309 milligr. 1 ; + 26,9 p. 100 ; —26,5 p. 100.

Lot n° 3. Nombre des matras : 19 témoins et 10 avec $4,3.10^{-9}$ de vanadium ; pH initial = 3,7. Température, 32°5. Durée de la culture, cinq jours effectifs (départ après trois jours) ; pH final = 3,7. Dans aucun des matras les spores ne couvrent la totalité de la surface du mycélium qui, de même que pour les lots n°s 1 et 2, est lavé avec de l'eau redistillée avant d'être mis à sécher. Dans ce lot, un des témoins a présenté, à un degré très accentué, le phénomène de collage des spores, puis du mycélium, sur les parois du récipient, bien qu'une agitation ait été faite, à deux reprises, au cours de la culture pour obvier à cet inconvénient.

Le poids sec moyen des témoins fut de 527 milligrammes ; + 14,6 p. 100 ; —29 p. 100 (en ne tenant pas compte de la culture ayant eu un accident).

Le poids moyen sec des cultures où la concentration du vanadium ajouté était de $4,3.10^{-9}$ fut de 385 milligr. 5 ; + 8,05 p. 100 ; —7,12 p. 100.

Tous ces résultats sont résumés sur la figure ci-après :

On retrouve ici le même phénomène qui s'était régulièrement

produit dans tous les essais antérieurs : les cultures avec vanadium ont entre elles des écarts plus faibles que les cultures témoins correspondantes.

Le poids moyen des cultures avec vanadium est nettement supérieur à celui des cultures sans vanadium, puisqu'il y a une augmentation de 20,9 p. 100 du poids. Mais, si, à ce dernier lot de matras nous appliquons la méthode d'interprétation donnée par Raulin, nous ne pouvons pas dire que le vanadium ait eu une action quelconque. En effet, parmi les témoins, le poids sec minimum P' était de 232 milligrammes et le poids sec maximum P de 375 milligrammes, le rapport $P'/P = 0,62$, alors que le rapport du poids moyen sec des témoins au poids moyen sec des cultures est de 0,850. Toutefois, si, au lieu de prendre P'/P avec les témoins, qui sont faits avec des cultures purifiées, on le prend, comme Raulin, avec les cultures comprenant tous les éléments, y compris celui que l'on étudie, le rapport P'/P devient $= 0,90$, permettant de conclure à l'utilité du vanadium.

La technique graphique va, non seulement donner une réponse sûre, mais encore des renseignements précieux.

Le graphique montre, d'une façon très nette, que, dans le lot n° 3, les cultures faites en présence de vanadium ajouté ont un poids moyen nettement plus élevé que celles faites avec le milieu purifié sans addition de vanadium. La comparaison ne peut pas être faite avec les autres lots, parce que les conditions sont légèrement différentes.

D'où viennent les variations anormales de poids ? En ce qui concerne les poids trop faibles, nous avons déjà vu que, dans certains récipients, les spores et même les jeunes cultures, malgré une agitation vigoureuse lors de l'ensemencement et, quand il le fallait, tout à fait au début de la croissance, collaient aux parois, faussant ainsi les conditions. Ce phénomène ne s'est jamais produit avec les premières cultures que j'ai faites en employant des milieux insuffisamment purifiés ou le milieu de Raulin beaucoup plus riche en sels que le dernier milieu utilisé. Il importe de remarquer que tous les récipients ne provenaient pas d'une même fabrication et que, par suite, il pouvait y avoir de petites différences dans les verres. Il n'est pas du tout certain, d'autre part, qu'en dehors

du vanadium que j'étudiais, le milieu purifié ait contenu, en quantité suffisante, tous les éléments nécessaires à la vie de l'*Aspergillus niger*. L'expérience suivante semble prouver la vraisemblance de cette hypothèse : le milieu utilisé avait été essayé avec des sels moins purs et de l'acide succinique non recristallisé dans l'acide sulfurique à 5 p. 100. Le rendement final des cultures fut de 530 milligr. 4 en moyenne, chiffre bien supérieur à ceux obtenus avec les cultures faites dans le milieu purifié au maximum pour la recherche de l'influence du vanadium. Cette expérience explique aussi les poids anormalement élevés : le verre se dissout toujours un peu dans le milieu et cette dissolution peut être différente suivant les récipients. Etant donné les très faibles quantités de substances nécessaires pour obtenir une petite variation de poids, il n'est pas surprenant, si l'élément manque dans le milieu de culture, de constater, dans les poids secs obtenus, des variations ne suivant pas les lois du hasard. Ces variations seraient dues aux différences de solubilité des parois des récipients. Si nous regardons le graphique, nous voyons tout de suite que, dans chacun des trois lots, le nombre des cultures d'un poids trop grand ou trop petit est sensiblement le même.

CONCLUSIONS.

Ce dernier fait donne à penser que le verre Pyrex a pu fournir aux cultures une certaine quantité de vanadium, très faible, mais suffisante pour augmenter le poids du mycélium. Une telle hypothèse n'est pas absurde en elle-même ; elle est parallèle à celle émise, puis vérifiée, à propos du manganèse, par Gabriel Bertrand [17]. L'analyse chimique des témoins, soit 24 gr. 67 de matière sèche, permet d'y trouver 3,2 γ de vanadium, chiffre bien supérieur à ce qu'il pouvait rester de ce métal dans les 4 litres de milieu de culture. Le seul contrôle réel et démonstratif consisterait à recommencer ces expériences en utilisant, tant pour la préparation des sels du milieu, que pour la culture, des récipients d'une composition telle qu'il ne puisse y avoir d'apport de vanadium, c'est-à-dire des récipients de platine ou de quartz, par exemple. Les circonstances actuelles ne me permettant pas, pour le

moment, d'entreprendre ce travail, j'ai dû interrompre mes recherches. Celles-ci, heureusement, ne sont pas inutiles, puisqu'elles ont permis de montrer que le vanadium n'est pas un élément indifférent pour l'*Aspergillus niger*, mais doit déjà, au contraire, être considéré comme un élément oligosynergique. Pour la souche utilisée, il suffit d'environ 2 milliardièmes de vanadium pour que la culture atteigne son poids maximum normal. En effet, l'*Aspergillus niger* ayant poussé sur un milieu constitué par des sels non purifiés renferme 152 γ de vanadium par kilogramme de matière sèche ; celui qui s'est développé sur le milieu purifié renferme 130 γ de vanadium par kilogramme de matière sèche, chiffre qui est du même ordre de grandeur et qui, par suite, semble représenter sensiblement la teneur normale de la souche considérée. Il s'ensuit que, pour obtenir une croissance normale, il faut que le milieu de culture renferme au moins la quantité de vanadium correspondant au rendement maximum normal, soit pour 1 litre : 2,2 γ (chiffre correspondant à un rendement de 16 gr. 27 de matière sèche, indiqué par Raulin comme étant le maximum normal que l'on puisse obtenir avec 46 gr. 7 de saccharose). La dernière expérience que j'ai faite a permis, comme l'a confirmé l'analyse chimique, d'avoir un milieu renfermant moins de vanadium que ce dernier chiffre et, d'autre part, les parois des récipients de culture n'ont apporté que trop peu de vanadium pour compenser cette différence. Si bien que j'ai pu obtenir une différence de poids suffisamment nette, 20,9 p. 100 entre les cultures témoins et celles dans lesquelles j'avais ajouté $4,3 \cdot 10^{-9}$ seulement de vanadium, démontrant ainsi que ce métal ne doit pas être considéré comme une impureté dans la matière vivante, mais qu'il y joue, au contraire, un rôle physiologique. De plus, ces expériences expliquent, en montrant la faible quantité de vanadium nécessaire, pourquoi cet élément avait échappé jusqu'ici aux chercheurs en tant qu'élément biologique.

Les quantités de vanadium en cause sont si faibles (2 milliardièmes) qu'on pourrait être tenté de rester sceptique s'il ne s'agissait que d'un cas isolé. Actuellement, il n'y a là rien qui doive nous surprendre et le rôle joué dans la vie par des quantités infiniment petites de métaux ou de métalloïdes est.

de plus en plus étudié. Le manganèse, pour en donner un exemple, avec des souches étudiées par Gabriel Bertrand [17], atteignait son optimum de concentration nutritive pour une concentration de l'ordre de 10 γ par litre de milieu de culture, c'est-à-dire seulement cinq fois plus que dans le cas du vanadium. Ceci est également vrai pour les métalloïdes : l'un des exemples les plus remarquables est celui du bore et de la maladie du cœur de la betterave [25] où la quantité de bore nécessaire pour empêcher cet accident est extraordinairement faible : puisqu'on n'en répartit d'ordinaire que de 3 à 5 kilogrammes à l'hectare, soit pour environ 7.500 tonnes de terre en admettant une profondeur utile de 0 m. 3.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BERTRAND (Didier). *Ces Annales*, **68**, 1942, p. 58.
- [2] BOKORNY. *Chem. Zeitschr.*, **28**, 1904, p. 596.
- [3] FROUIN et M^{lle} LEDEBT. *C. R. Soc. Biol.*, **72**, 1912, p. 72.
- [4] FROUIN et MERCIER. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **1**, 1914, p. 8.
- [5] JAVILLIER. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **1**, 1914, p. 55 et *Bull. Soc. Pharm.*, **2**, 1914, p. 452.
- [6] BURK et HORNER. *Trans. 3rd Und. Conor. Doil. Sc. Oxf.*, **1**, 1935, p. 152.
- [7] BORTELS. *Ber. Deut. Bot. Ges.*, **56**, 1938, p. 153.
- [8] SUZUKI. *Bull. Agr. Tokyo*, **5**, 1903, p. 513.
- [9] RAMIREZ. *Univ. La Plata, E. S. R.*, **32**, 1914, p. 628.
- [10] KRIOUKOV. *Oudsbreni Ourojaš*, **3**, 1931, p. 627 (extr. de *Chim. et Ind.*, **28**, 1932, p. 443).
- [11] BRECHKY et WINIFRIED. *J. of Agr. Sc.*, **22**, 1932, p. 704.
- [12] SCHARRER et SCHROPP. *Z. für Pflanz. Düng. Boden*, **37**, 1935, p. 196.
- [13] SHIBUYA et PARKI. *J. Soc. Trop. Agr. Japan*, **6**, 1934, p. 721.
- [14] BERTRAND (Gabriel). *Z. für angew. Chem.*, **44**, 1931, p. 917.
- [15] GERICKE et RENNEKAMPFF. *Prakt. Blätter Pflanzenbau Pflanzensch.*, **17**, 1939, p. 17 et *Bodenk. u. Pflanz.*, **18**, 1940, p. 305 (extr. de *Chim. Abst.*, **34**, 1940, p. 2119 et de SCHARRER : *Die Phosphorsäure*, **10**, 1941, p. 93).
- [16] PASTEUR. *Ann. de Chim. et Phys.*, 3^e série, **64**, 1862, p. 109.
- [17] BERTRAND (Gabriel). *C. R. Ac. Sc.*, **154**, 1912, p. 616 et *Bull. Soc. Chim.* 4^e série, **11**, 1912, p. 400 et *ces Annales*, **26**, 1912, p. 767.
- [18] RAULIN. *Thèse Paris*, 1870 (réimpression 1905).
- [19] STEINBERG. *J. of Agr. Res.*, **55**, 1937, p. 891 et **57**, 1938, p. 569.
- [20] TERROINE et WURMSER. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **4**, 1922, p. 519.
- [21] MÜLDER. *Ann. Ferm.*, **4**, 1938, p. 513.
- [22] LEPIERRE. *Arq. Inst. Bact. Camera Pestana*, **4**, 1913, p. 93.
- [23] BERTRAND (Didier). *Thèse Paris*, 1941.
- [24] BERTRAND (Didier). *Bull. Soc. Chim.*, 11 juillet 1941.
- [25] BERTRAND (Gabriel). *Ann. Ferm.*, **5**, 1939, p. 369.

ASSOCIATION DES MICROBIOLOGISTES DE LANGUE FRANÇAISE

(*Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15^e.*)

Séance du 8 janvier 1942.

COMMUNICATIONS (*SUITE ET FIN*)

ACTION DES RAYONS LUMINEUX SUR LE BACTÉRIOPHAGE

par A. GUELIN.

On sait que les rayons X, les rayons ultra-violet, la chaleur sont capables d'inactiver les bactériophages. Au cours de recherches poursuivies avec R. Wahl, nous avons constaté que les radiations de la partie visible du spectre avaient la même propriété.

La difficulté qu'on éprouve à dissocier leur action de celles d'autres facteurs, tels que la température, la composition du milieu, le pH explique que le fait n'ait pas été encore remarqué.

C'est grâce à la sensibilité à la lumière véritablement surprenante du bactériophage S 13, actif pour le bacille dysentérique Y, que nous avons pu le mettre en évidence. Un autre bactériophage, qui lyse le même germe, le C 16, est beaucoup plus résistant. Il nous a fourni l'élément de comparaison indispensable.

Nos expériences ont été faites pour la plupart sur des suspensions de bactériophages en solution de chlorure de sodium à 7,5 p. 1.000 dans l'eau bidistillée. Ces suspensions contenaient environ 10^9 éléments par centimètre cube et les expériences portaient sur 10 c. c. contenus dans des tubes de verre, tous de même calibre et de même largeur (tubes de 18). Les titrages étaient faits par numération des plages, les chiffres donnés étant calculés sur les moyennes de deux titrages.

Toutes les expériences étaient faites parallèlement sur les deux bactériophages et dans des conditions rigoureusement identiques (temps d'exposition, éclairement, etc...).

Dans ces conditions on constate que la lumière inactive très vite et souvent complètement le bactériophage S 13, et beaucoup plus lentement et plus partiellement le C 16. Des suspensions témoins des deux bactériophages, maintenues à l'obscurité pendant les mêmes temps, ne subissent qu'une légère diminution de titre.

La sensibilité du bactériophage S 13 est si grande que son titre baisse très fortement s'il se trouve exposé d'une façon discontinue à la lumière pendant une demi-heure à deux ou trois reprises. Ce fut d'ailleurs ce qui attira notre attention sur une action de la lumière ; nous avons pu la démontrer par les expériences suivantes :

Les tubes exposés à la lumière étaient placés devant une fenêtre fermée, inclinés à 45° sur une table de lave blanche. Les témoins étaient enfermés dans une boîte tapissée intérieurement de papier noir et placée à côté. Les titrages étaient faits dans la chambre-étuve même, sous un éclairage faible et à la lumière rouge. L'inactivation est plus ou moins rapide et complète suivant les qualités de la lumière au moment de l'expérience. Elle varie donc suivant les jours, les heures, l'exposition de la pièce, mais le phénomène est toujours extrêmement net, même quand la lumière est peu intense.

Voici, par exemple, une expérience où les tubes étaient exposés entre 10 heures et 16 heures, au mois de mai, par un temps clair, dans une pièce prenant jour au nord.

Ci-dessous la quantité (pourcentage du titre initial) de bactériophage existant au bout des temps indiqués en tête des colonnes :

	30 MINUTES	2 HEURES	6 HEURES
Bactériophage S 13 :			
Lumière.	23,5	3,5	0,5
Obscurité.	100	90,6	57
Bactériophage C 16 :			
Lumière.	85	48	19
Obscurité.	100	100	71

En même temps, on exposait dans une autre pièce, prenant jour au midi, un autre échantillon de la même suspension de S 13, en évitant de le placer sur le trajet des rayons solaires. Au bout d'une demi-heure déjà, le S 13 était totalement inactivé.

Le bactériophage S 13 est donc beaucoup plus sensible à la lumière que le C 16 ; par exemple le premier perd 77 p. 100 en demi-heure, alors que le C 16 ne perd que 15 p. 100. Cependant les témoins à l'obscurité perdent aussi progressivement une partie

de leur activité. Cette baisse est, elle aussi, plus rapide et plus forte pour le S 13 que pour le C 16. Dans les conditions d'expérience la lumière n'est donc pas seule en cause, mais les autres facteurs ont une importance minime à côté d'elle. Tous ne sont pas connus, mais la température en est un.

Des expériences de Wollman et M^{me} Wollman (1) ont montré qu'à 55° le S 13 est beaucoup plus sensible que le C 16 : le premier est rapidement détruit (il n'en reste que 6 p. 100 après dix minutes, alors qu'il reste 25 p. 100 du C 16 après trois heures).

On constate qu'à la glacière au bout de six heures une suspension telle que celles qui ont servi aux expériences, garde son titre, alors qu'à 22° le C 16 perd environ 25 p. 100, le S 13, 40 p. 100.

Détermination de la partie active du rayonnement solaire. — Nous avons cherché à déterminer à quelle partie du rayonnement solaire il faut attribuer cette action sur le bactériophage.

S'agit-il des ultra-violets, des infra-rouges ou des rayons lumineux de diverses longueurs d'onde ?

Hallauer (2) ainsi que Rouyer et Prudhomme (3) ont montré que les bactériophages sont très sensibles aux rayons ultra-violets de courte longueur d'onde : mais c'est le C 16 qui est plus sensible à ces rayons, et non le S 13. Ceci déjà n'est pas en faveur d'une intervention des rayons ultra-violets dans nos expériences, où le C 16 résiste mieux, au contraire, que le S 13.

En outre, ces rayons de courte longueur d'onde sont arrêtés par un double écran de verre : les vitres de la pièce et le tube où se trouve la suspension de bactériophage. Dans ces conditions, seuls passent les ultra-violets de longueur d'onde comprise entre 3.600 et 4.000 Armstrongs. Nos deux bactériophages résistent bien à ceux-ci, comme le montre l'expérience suivante :

Des suspensions de bactériophages S 13 et C 16 sont placées à 50 cm. d'une source puissante de rayons ultra-violets (lampe en quartz à vapeur de mercure ; brûleur à courant continu de 5 ampères sur 100 volts. Interposition d'un écran de Wood, pour éliminer les rayons visibles). Une suspension témoin de S 13 est placée à côté des autres, mais avec interposition entre elle et la source d'un verre spécial arrêtant complètement les rayons ultra-violets. Après une heure et demie d'exposition, le titre du bactériophage s'est maintenu le même dans les 3 tubes. Or, dans ces conditions, les tubes reçoivent beaucoup plus de rayons ultra-violets qu'en six heures à la lumière solaire.

Les rayons infra-rouges jouent sans doute un certain rôle, mais il ne semble pas que celui-ci soit très important. Des expériences plus précises sont en cours au sujet de ces rayons.

(1) E. WOLLMAN et M^{me} WOLLMAN, *C. R. Acad. Sci.*, 1940, **241**, 270.

(2) HALLAUER, *Zeitschr. Hyg.*, 1935, **417**, 18.

(3) ROUYER et PRUDHOMME, *C. R. Soc. Biol.*, 1941, **435**, 1126.

Il semble bien que dans nos expériences ce soient surtout les rayons visibles qui sont en jeu et qui détruisent presque à eux seuls le bactériophage S 13. Les rayons actifs sont dans la moitié du spectre visible qui correspond aux longueurs d'onde les plus courtes, ainsi que le montrent les résultats obtenus en interposant entre les tubes contenant la suspension de S 13 et la lumière, des écrans constitués par des liquides colorés (écran rouge constitué par une solution de bichromate de potasse ; écran bleu par une solution de sulfate de cuivre ammoniacal).

L'écran rouge protège très nettement le bactériophage, alors que l'écran bleu n'atténue que beaucoup plus faiblement l'action de la lumière solaire.

Voici, par exemple, une expérience :

	POURCENTAGE DU TITRE INITIAL restant au bout de		
	30 minutes	2 heures	6 heures
Lumière blanche	20	5	0
Écran rouge	100	83	80
Écran bleu	100	50	29
Obscurité	100	100	70

Cependant ces liquides colorés ne sont pas des écrans suffisamment sélectifs. D'autres expériences sont en cours sur ce sujet.

Mécanisme de l'action de la lumière. — La destruction du bactériophage sous l'action de la lumière pouvait être due à des phénomènes d'oxydation. Pour rechercher le rôle de ces phénomènes nous avons soumis à l'action de la lumière des suspensions de bactériophages placées dans des tubes scellés sous le vide. Le vide a été fait avec une pompe à huile.

	POURCENTAGE DU TITRE INITIAL restant au bout de		
	30 minutes	2 heures	6 heures
Obscurité (dans l'air)	100	100	60
Lumière (dans l'air)	20	5	0
Lumière (sous vide)	70	23	8

Ces expériences ne sont pas concluantes, car bien que plus faible dans ces conditions, l'action de la lumière est encore très nette dans les tubes où le vide avait été fait. Mais, dans ceux-ci, il est certain que tout phénomène d'oxydation n'est pas éliminé.

En conclusion : les bactériophages S 13 et C 16 sont sensibles à l'action des rayons visibles lumineux. Les rayons actifs paraissent se trouver dans la région du violet et du bleu. Il agissent peut-être en partie en favorisant des réactions d'oxydation.

(Institut Pasteur.)

Séance du 5 février 1942.

Présidence de M. JACQUES TRÉFOUËL.

COMMUNICATIONS

**DU COMPORTEMENT RESPECTIF
DU DERMO- ET DU NEURO-VACCIN
A L'ÉGARD DU SYSTÈME NERVEUX AUTONOME**

par P. GASTINEL et R. FASQUELLE.

Le virus vaccinal acquiert dans certaines conditions des propriétés nouvelles qui lui assurent des affinités nerveuses telles que Levaditi l'a dénommé Neuro-Vaccin. Nous n'avons pas à rappeler ici comment les premières souches ont été obtenues après des passages intratesticulaires et intracérébraux chez le lapin, ni comment par la culture du virus vaccinal selon les différentes méthodes, et notamment la technique en chorio-allantoïde, on transforme un dermo-vaccin en virus à affinités nerveuses (et aussi mésodermiques) très accusées.

Ce qui caractérise un tel virus, c'est que son introduction intracérébrale chez le lapin provoque à tous coups une encéphalite mortelle avec pullulation du virus dans les deux hémisphères et généralisation du germe vaccinal, traduite par l'apparition de pustules sur une plage cutanée épilée ; par les autres voies (testiculaire, intraveineuse, nerfs périphériques), le virus peut également gagner les centres nerveux, mais toujours en proportions réduites et sans entraîner la mort de l'animal ; pour le retrouver en quantité importante dans le cerveau, il faut avoir recours à l'artifice consistant à déterminer une irritation préalable des méninges et de l'encéphale par injection d'eau salée ou de bouillon (1).

Or, parmi toutes les voies de pénétration du virus vaccinal appliquées à l'étude de la neuro-vaccine, il en est une au moins

(1) LEVADITI et NICOLAU, ces *Annales*, 1923, 37, 1.

qui, à notre connaissance, n'a pas fait l'objet d'investigations suivies, à savoir : le système sympathique.

Nous avons été amenés à envisager ce problème en raison des recherches antérieures concernant la manière dont les toxines microbiennes, et différents autres produits d'ailleurs, sont susceptibles d'agir sur l'appareil autonome en déterminant des syndromes superposables, au degré d'intensité près (2).

Cette investigation paraissait d'autant plus justifiée que nous avions auparavant constaté la présence de neuro-vaccin dans le système sympathique (ganglion cervical supérieur) d'animaux atteints d'encéphalite après inoculation intracérébrale.

Nous rapporterons brièvement le schéma de nos expériences.

I. — Chez un lapin, une laparotomie est faite et un neuro-vaccin dont l'activité est contrôlée sur des animaux témoins par inoculation *cutanée* d'une part, inoculation *intracérébrale* d'autre part, est introduit dans la région *péri-splanchnique* gauche.

En trois à quatre jours l'*animal meurt* sans présenter aucun signe apparent d'encéphalite et l'on constate à l'autopsie les réactions habituelles observées après dépôt de substances toxiques dans le système autonome abdominal, à savoir : rougeur de la paroi, taches ecchymotiques, ganglions tuméfiés et infarcis, réaction des plaques de Peyer, quelques taches purpuriques sur l'estomac. Le prélèvement du cerveau et son passage montrent que le virus *y végète en quantité abondante*.

Citons entre autres le protocole du lapin F 43 :

Laparotomie le 12 octobre 1941. Inoculation dans la région péri-splanchnique gauche de 1/10 de centimètre cube du broyat de I décigramme dans 1 c. c. d'eau salée du cerveau du lapin F 44 mort d'encéphalite vaccinale. Mort le 15 octobre 1940 sans manifestations nerveuses. Le cerveau prélevé donne sur la plage cutanée rasée du lapin neuf F 49 l'éruption de 10 pustules vaccinales typiques.

II. — Par contre, si la même expérience est effectuée avec un dermo-vaccin, l'injection péri-splanchnique ne provoque aucune manifestation ; l'*animal survit*, il acquiert l'immunité ainsi qu'en témoigne le résultat négatif d'une vaccination d'épreuve ultérieure ; si l'on sacrifie l'animal, on ne constate sur les organes, ganglions, péritoine aucune des réactions signalées précédemment ; d'autre part, le *cerveau est avirulent*.

III. — On aurait pu se demander si les réactions abdominales observées n'étaient pas en quelque manière provoquées par le

(2) REILLY et coll., *C. R. Soc. Biol.*, 1934, **116**, 24 et *Ann. Médecine*, 1936, 120 et 165.

simple dépôt autour du nerf splanchnique des produits constitutifs du neuro-vaccin. Or l'injection d'un *neuro-virus tué* par chauffage laisse, dans les mêmes conditions expérimentales, l'animal totalement indifférent.

IV. — Un autre contrôle s'imposait. Qu'advient-il lorsqu'un neuro-vaccin dûment vérifié quant à sa virulence est simplement injecté dans la *cavité péritonéale* ? Or, dans ce cas, le neuro-vaccin ne provoque aucune des réactions si caractéristiques de l'injection péri-splanchnique. L'animal survit, et, si on le sacrifie, tout se borne à une légère réaction péritonéale, analogue à celle que Borrel a signalée dans les mêmes circonstances (3). L'expertise du cerveau le montre *avirulent*.

V. — Nous avons recherché par ailleurs si l'inoculation de neuro-vaccin dans d'autres segments de l'appareil autonome produisait des manifestations comparables.

L'insertion de neuro-vaccin dans la gaine des vaisseaux fémoraux n'est suivie de l'apparition d'aucun fait notable.

Le dépôt de neuro-vaccin dans le *ganglion cervical supérieur* sympathique ne provoque pas, dans nos expériences actuelles, une réactivité de l'appareil nerveux ; le virus ne monte pas non plus vers les centres supérieurs, ainsi qu'en témoigne l'absence complète de virulence du cerveau lorsque l'animal est sacrifié dans un délai de dix jours.

Même expérience a été faite par inoculation dans le *ganglion stellaire* d'un lapin ; celui-ci n'a présenté aucune manifestation morbide ; il a été sacrifié au dixième jour ; son cerveau ne contenait pas de virus, mais le ganglion sympathique, augmenté de volume, a fourni par passage par voie intradermique à un animal neuf une réaction de neuro-vaccin typique ; cette éruption fut suivie (nous le signalons à titre de document) d'une généralisation de pustules sur tout le corps et même en des zones non épilées.

Nous nous bornerons à citer les faits précédents, sans pouvoir expliquer actuellement l'origine de cette discordance entre les résultats obtenus lorsque l'on intervient sur le splanchnique ou les autres portions de l'appareil autonome.

VI. — Parallèlement, si on étudie la virulence du cerveau d'un animal ayant reçu du neuro-vaccin dans un *nerf périphérique* (sciatique, ou crural) on remarque avec netteté que le virus n'est présent qu'en très faible quantité ou même absent dans l'encéphale, par opposition à la constance et à l'abondance avec lesquelles il y est décelé dans l'éventualité de l'injection péri-

(3) BORREL, C. R. Soc. Biol., 1936, 121, 1084.

splanchnique. Cette constatation ne peut être faite qu'en sacrifiant l'animal, car jamais l'injection de neuro-vaccin dans un nerf périphérique n'a été suivie de la mort du lapin.

VII. — Enfin, chez des animaux antérieurement vaccinés par voie tégumentaire avec un dermo- ou un neuro-vaccin, l'inoculation ultérieure péri-splanchnique de neuro-vaccin demeure sans aucun effet et le virus ne gagne pas l'encéphale. L'état réfractaire déterminé par la vaccination cutanée rend le neuro-vaccin inactif sur le splanchnique comme le serait ce virus tué par chauffage chez un animal neuf.

En résumé :

1° Le neuro-vaccin est susceptible d'agir à la manière des toxines en provoquant un même tableau réactionnel à l'intensité près, lorsqu'il est déposé au contact du splanchnique ; introduit par cette voie, il détermine la mort de l'animal.

2° A partir de ce point d'inoculation, il gagne par un mécanisme que nous n'envisageons pas ici les centres supérieurs, et cela en quantité beaucoup plus considérable que par toute autre voie d'inoculation, sauf la voie cérébrale elle-même.

3° De telles propriétés sont strictement réservées dans nos protocoles au virus vaccinal ayant acquis les caractères d'un neuro-vaccin et, en aucune circonstance, nous ne les avons observées avec les souches habituelles de dermo-vaccin de génisse.

4° L'état réfractaire acquis après vaccination cutanée par un dermo- ou un neuro-vaccin préserve l'animal contre cette inoculation péri-splanchnique de neuro-virus qui apparaît si sévère chez l'animal neuf.

(Laboratoire de Bactériologie, Faculté de Médecine.)

M. Mollaret: Je n'ai aucunement la prétention de résoudre l'interrogation par laquelle M. le professeur Gastinel vient de clore son remarquable exposé. Ne peut-on cependant se demander s'il n'y a point une relation éventuelle entre le rôle exceptionnel du splanchnique et celui de la glande surrénale ? Autrement dit, n'y aurait-il pas un intérêt à pratiquer la même inoculation chez un animal préalablement surrénalectomisé du côté de l'inoculation (ceci pour éviter les complications d'une surrénalectomie double ?)

CONTRIBUTION
A L'ÉTUDE DE LA LIBÉRATION CHRONIQUE
DE L'AMMONIAC
PAR LES NODULES RADICULAIRES DES LÉGUMINEUSES

par M^{me} HÉLÈNE WINOGRADSKY.

Les recherches effectuées avec S. Winogradsky (1) ont établi que les nodules des Légumineuses séparés des racines qui les portent sont des foyers de dégagement d'ammoniac, de véritables petites usines, lesquelles fonctionnent sans répit pendant des années.

Les plants (pois ou haricots) arrachés vers la période de la floraison, on en détache les nodules, on les lave et les sèche à 50°; c'est dans cet état quasi naturel, mais séchées à l'air, que ces formations servent aux expériences.

L'eau, qui les gonfle et qui fait jouer les actions enzymatiques, est rigoureusement exclue des expériences. Mais la libération de l'ammoniac est en étroite dépendance de l'état hygrométrique des nodules. Séchés sur acide sulfurique à 50° jusqu'à poids constant, ils n'en donnent pas; il suffit de les laisser une heure sur une table de laboratoire pour que le dégagement, accompagné d'une augmentation de poids, reprenne. Un temps dans une chambre humide, suivi d'un séjour sur acide sulfurique à 50-55° conduit à un rendement maximum.

Ce qui est évident, c'est qu'il s'agit là d'une action catalytique, comparable à celle des enzymes. Elle en diffère nettement par son haut degré de thermo-résistance. Un autoclavage à 120° pendant trente minutes ne la supprime pas, tandis que l'uréase que contiennent constamment les nodules est rapidement détruite vers la température de 100° et même au-dessous.

Mais ce qui est frappant, c'est que l'autoclavage, non seulement ne détruit pas le système catalyseur, mais lui confère un surcroît, ou un regain, d'activité. Le fait a été déjà brièvement mentionné (*loc. cit.*); il a été confirmé par une suite d'expériences.

Pour donner une idée concrète sur le procédé employé, aussi simple que sûr, nous présentons la petite boîte hermétique, où les

(1) S. WINOGRADSKY et H. WINOGRADSKY, *C. R. Ac. Sci.*, 1941, 213, 413.

nodules sont tenus dans le voisinage immédiat d'une dose, toujours la même, d'acide sulfurique (soit XXV gouttes). On prend deux portions de 3 g. de nodules de pois 1940, l'une autoclavée à 120°, l'autre employée telle quelle; les deux sont placées dans deux boîtes hermétiques identiques, humidifiées pareillement, tenues ensuite vingt-quatre heures ou quarante-huit heures à 50°-55° sur SO_4H_2 ; la capsule est lavée avec de l'eau exempte d'ammoniac, les eaux de lavage portées à 100 c. c., enfin nesslerisées. Une expérience à blanc est jointe à toutes les épreuves.

Cette portion de 3 g. peut servir comme exemple de la chronicité de la production d'ammoniac : les nodules de pois utilisés ont été récoltés en 1940, il y a presque deux ans. Au cours des épreuves commencées au mois de juin 1940, elle a déjà totalisé plus de 5.000 γ d'azote ammoniacal. Et le dégagement est toujours en train. Il va sans dire que les portions autoclavées datent de la même année et ont été prélevées sur le même lot de plantes.

Voici les graphiques qui résument les résultats de l'une des séries d'épreuves qui ont été exécutées au cours de sept mois.

On voit très nettement que les rendements de la portion autoclavée sont nettement supérieurs à ceux de la portion non autoclavée, et cela dès le début des épreuves, c'est-à-dire immédiatement après l'autoclavage.

Dans la suite, après plusieurs dizaines d'épreuves, on voit le rendement faiblir, jusqu'à ce que la différence entre les deux s'efface ou même devienne négative.

Mais si on refait l'autoclavage une seconde fois, le rendement remonte, jusqu'à ce que la différence redevenue positive. Il y a donc un regain d'activité, comme suite du chauffage sous pression.

On ne saurait expliquer ce fait sans se faire une idée assez claire sur la nature du système catalytique qui agit dans ce cas. On n'en est pas encore là. Mais le fait brut attire déjà l'attention, comme étant d'un caractère tout particulier en biologie.

Il est naturel qu'au cours des expériences sur les fixateurs, la question surgisse de savoir quelle est l'origine de l'azote ammoniacal dégagé? Provient-il de l'air ou de l'azote combiné de la matière? La première alternative paraît la plus probable, par analogie avec les *Azotobacter* (expériences de Winogradsky). Mais il n'est pas encore possible de présenter une conclusion définitive, le problème étant d'une nature très complexe.

(Institut Pasteur, Brie-Comte-Robert.)

L'ACTION DE LA VITAMINE C SUR LA MULTIPLICATION DE *PROTEUS VULGARIS*

par ANDRÉ LWOFF et MADELEINE MOREL.

Au cours de recherches (1) concernant l'action inhibitrice de diverses substances sur le développement de *Proteus vulgaris*, nous avons été amenés à constater que l'acide l-ascorbique peut, dans certaines conditions, empêcher la multiplication microbienne jusqu'à la dilution de 1 p. 100.000. En fait, ce n'est pas la vitamine C qui agit, mais l'eau oxygénée, produit intermédiaire de son oxydation.

La souche a été cultivée et les expériences réalisées dans le milieu synthétique précédemment décrit (2). La solution de vitamine C a été préparée au moment même de l'emploi. Elle est neutralisée et filtrée sur bougie Chamberland L₃.

Expérience-type d'inhibition de *Proteus vulgaris* par la vitamine C.

ENSEMENCEMENT pratique avec 1 goutte d'une souche de 24 heures	CONCENTRATION EN VITAMINE C						
	0	1 p. 50.000			1 p. 10.000		
	24 h.	24 h.	48 h.	72 h.	24 h.	48 h.	72 h.
Non diluée	+++	±	+++	+++	0	±	+++
Diluée 10 fois	++	0	±	+++	0	0	++
Diluée 100 fois	+	0	0	+	0	0	0

Le tableau ci-contre montre les résultats d'une expérience-type. On voit que la durée de la phase négative dépend de deux facteurs : la dilution de la culture-souche, la concentration en acide ascorbique. A concentration égale d'acide ascorbique, la durée de l'inhibition est d'autant plus longue que l'ensemencement a été moins abondant. A ensemencement égal, l'inhibition est

(1) Un mémoire est à l'impression à ces *Annales*.

(2) M. MOREL, ces *Annales*, 1941, 67, 285 et 449.

d'autant plus longue que la concentration en acide ascorbique est plus élevée. En présence d'acide ascorbique à 1 p. 10.000, si l'ensemencement est effectué avec une souche diluée à 1 p. 100, l'inhibition est totale, c'est-à-dire que l'acide ascorbique exerce une action bactéricide. Les données quantitatives concernant l'action de l'acide ascorbique sont donc forcément relatives.

L'addition de certaines substances au milieu synthétique empêche l'action de l'acide ascorbique de se manifester. C'est ainsi qu'il suffit d'ajouter, à 5 c. c. de milieu, 1 goutte d'une solution à 2 p. 100 de « protéose peptone Difco » pour supprimer complètement l'action inhibitrice de l'acide ascorbique à 1 p. 50.000. 1 goutte d'eau peptonée à 1 p. 2.000 exerce la même action, c'est-à-dire qu'en présence de peptone à 1 p. 200.000, l'action inhibitrice de l'acide ascorbique à 1 p. 50.000 est supprimée.

La cystéine à 1 p. 2.000.000 supprime également l'action inhibitrice de la vitamine C à 1 p. 50.000. Le glutathion à 1 p. 200.000, le sulfure de sodium à 1 p. 100.000 possèdent la même propriété. De plus, il existe une relation entre la concentration en acide ascorbique et la concentration en cystéine nécessaire pour supprimer l'action inhibitrice. La concentration en cystéine doit atteindre, en poids, la quarantième partie de la concentration en vitamine C pour que l'activité de celle-ci soit supprimée. On sait que la cystéine diminue considérablement ou même supprime l'oxydation de l'acide ascorbique par le cuivre. Puisque les substances empêchant l'oxydation de l'acide ascorbique suppriment son action inhibitrice à l'égard des bactéries, on devait envisager l'hypothèse que ce n'était pas l'acide lui-même qui agissait mais un produit de son oxydation. Si cette hypothèse était exacte, on pouvait s'attendre à ce que les solutions d'acide ascorbique oxydé fussent beaucoup plus actives que les solutions récemment préparées. Mais l'oxydation préalable, bien loin d'augmenter le pouvoir inhibiteur de la solution, le diminue.

Deux faits se dégagent donc de l'ensemble de ces expériences : 1° les substances empêchant l'oxydation de l'acide ascorbique suppriment son action inhibitrice ; 2° l'acide ascorbique oxydé est dépourvu d'action inhibitrice.

Ces deux constatations semblaient quelque peu contradictoires. Mais l'action de l'acide ascorbique pouvait être due à une substance fugace se formant au cours de l'oxydation de la vitamine C, substance qui pouvait être l'eau oxygénée.

Si celle-ci est responsable de l'action inhibitrice de la vitamine C introduite dans le milieu, les substances à action peroxydasique ou catalasique doivent supprimer cette action. Tel est effectivement le cas. L'action inhibitrice de la vitamine C à 1 p. 50.000 est supprimée par : le sang de lapin, hémolysé, à 1 p. 200.000, la protohème à 1 p. 10.000.000, la peroxydase de Wolff à 1 p. 100, le ferrocyanure de potassium et le sulfate ferreux à 1 p. 200.000.

Les substances organiques ou minérales à action catalasique ou peroxydasique suppriment donc l'activité inhibitrice de l'acide ascorbique. Comme les sels de fer sont dépourvus d'action sur l'oxydation de la vitamine C, on peut conclure qu'ils agissent dans nos expériences en détruisant l'eau oxygénée.

Strangeways (3) qui a constaté l'absence d'effet trypanocide dans le vide et la suppression de l'action trypanolytique de la vitamine C par une préparation de catalase, a rapporté l'action de l'acide ascorbique à l'eau oxygénée formée durant son oxydation. La formation d'eau oxygénée pendant l'oxydation de la vitamine C a été effectivement constatée par Holtz et Triem (4) et par Schales (5). Les quantités décelées sont au voisinage de la limite de sensibilité des réactions dont l'ordre de grandeur est de 1 p. 5.000.000.

Il restait à vérifier qu'à des dilutions de cet ordre l'eau oxygénée est effectivement active.

L'eau oxygénée, à une dilution de 1 p. 4.000.000 à 1 p. 400.000, exerce une action inhibitrice sur *Proteus vulgaris*, action d'autant plus longue que la concentration est plus élevée.

Une solution d'eau oxygénée à $1,4 \text{ M} \times 10^{-8}$ se comporte à peu près comme une solution d'acide ascorbique à $1,1 \text{ M} \times 10^{-6}$. Enfin, l'hémine et le sulfate ferreux suppriment l'action de l'eau oxygénée comme ils suppriment celle de l'acide ascorbique.

Aux concentrations supérieures à 1 p. 400.000, l'eau oxygénée possède une action bactéricide nette. C'est ainsi qu'à une concentration de 1 p. 80.000, il n'y a pas de développement dans des tubes de 5 c. c. de milieu ensemencés avec 1 goutte d'une souche diluée au 1/10. Si, vingt-quatre heures après l'ensemencement, on ajoute de la catalase, on obtient une culture abondante deux jours après. L'addition de catalase est sans effet si celle-ci est ajoutée quarante-huit heures après l'ensemencement en milieu + eau oxygénée à 1 p. 80.000.

Pas plus pour l'eau oxygénée que pour l'acide ascorbique, ces données quantitatives n'ont une valeur absolue. Elles dépendent bien entendu, à concentration égale d'eau oxygénée, de l'importance de l'ensemencement.

Ces résultats peuvent être interprétés de la manière suivante. *Proteus vulgaris* possède une catalase très active et est aussi très riche en corps à fonction peroxydasique. Il y a donc, dans les cultures de *Proteus*, une tendance à la destruction de l'eau oxygénée et l'on conçoit facilement que l'intensité de cette action destructrice dépende de la valeur du rapport : nombre de bactéries/nombre de molécules d'eau oxygénée.

(3) W. I. STRANGWAYS, *Ann. Trop. Med. a. Parasit.*, 1937, **31**, 1039.

(4) HOLTZ et TRIEM, *Zeitschr. physiol. Chem.*, 1937, **248**, 1.

(5) SCHALES, *Ber. deut. Chem. Gesell.*, 1938, **71**, 447.

L'eau oxygénée est également bactéricide en eau peptonée. Mais elle n'agit qu'à des concentrations beaucoup plus élevées que dans le milieu synthétique. Dans une solution de « protéose peptone Difco » à 2 p. 100, la multiplication se produit encore pour une concentration de 1 p. 400.000. Le développement est inhibé à 1 p. 40.000 seulement. Ceci tient vraisemblablement à ce que l'eau oxygénée doit être détruite plus rapidement en présence de peptone, destruction dont les propriétés des sels de fer et des actions de surface peuvent être tenues pour responsables.

En présence de substances empêchant l'oxydation de l'acide ascorbique, celui-ci ne manifeste pas d'action inhibitrice. En l'absence d'oxygène, la vitamine C perd également cette propriété.

La très grande sensibilité à l'acide ascorbique n'est pas un caractère propre à *Proteus vulgaris* ; nous l'avons retrouvée chez *B. subtilis* et *E. coli*, dont le développement en milieu synthétique est inhibé par la vitamine C à 1 p. 50.000. Cette action inhibitrice est supprimée par la cystéine à 1 p. 500.000. *B. subtilis*, aérobie strict, et *E. coli*, aérobie facultatif, se comportent donc comme *Proteus vulgaris*.

Ehrismann (6) est arrivé à la conclusion que l'action inhibitrice de l'acide ascorbique — à concentration élevée — est due à un changement de potentiel d'oxydo-réduction du milieu. Nos expériences montrent que l'action inhibitrice ou bactéricide de l'acide ascorbique, agissant en milieu synthétique à très faible concentration, est due à l'eau oxygénée qui se forme. On s'explique ainsi que toutes les tentatives d'utilisation de la prétendue activité antimicrobienne de la vitamine C pour le traitement d'infections diverses n'aient donné jusqu'ici que des résultats négatifs, qu'il s'agisse de la tuberculose dans les expériences de Boissevain et Spillane, ou du charbon dans celles d'Ehrismann.

L'expression « action inhibitrice » qui a été utilisée pour définir l'action de la vitamine C sur les bactéries, n'a donc qu'une valeur purement descriptive. Il s'agit en fait d'une action antiseptique, soit partielle, soit totale. Il n'y aurait donc pas de différence fondamentale entre la prétendue action inhibitrice et la prétendue action bactéricide de l'acide ascorbique puisqu'il s'agit en somme des diverses modalités de l'action antiseptique de l'eau oxygénée.

(Institut Pasteur, Service de Physiologie microbienne.)

(6) EHRLMANN, *Zeitschr. Hyg.*, 1936, **118**, 544 ; *Zeitschr. Hyg. u. Infektionskr.*, 1940, **123**, 16.

RECHERCHES SUR UNE NOUVELLE ESPÈCE ANAÉROBIE *RAMIBACTERIUM ALACTOLYTICUM* (KOV. SPEC.)

par A.-R. PRÉVOT et J. TAFFANEL.

Du pus d'un ostéophlegmon du maxillaire (1) nous avons isolé d'abord la souche « AL 3 » d'une bactérie anaérobie ne se laissant identifier à aucune espèce connue. Peu de temps après nous avons isolé, du pus d'une cellulite jugale d'origine dentaire (2), une nouvelle souche « FA 4 » identique à la première, et du pus d'un abcès jugal également d'origine dentaire (3) une troisième souche « JD 2 » identique aux précédentes. Ces trois souches appartiennent à une espèce nouvelle (4) dont voici la description :

Morphologie : Bâtonnet droit mesurant $1,5 \mu$ à 2μ de long sur $0,3 \mu$ de large, se présentant rarement isolé ou en paires, mais presque toujours en chaînettes de 4 à 12 éléments, sinueuses ou en lignes brisées, avec des aspects en V, en L et en Y, c'est-à-dire des pseudo-ramifications (ne présentant jamais de ramifications secondaires). Ce bâtonnet est immobile, asporulé et Gram-positif. Dans les vieilles cultures, il se résout en granules irréguliers simulant des cocci très fins en amas ou en courtes chaînettes.

Physiologie : Anaérobie très strict, poussant bien entre 33° et 37° (très mal à 22° , et jamais à 40°). Thermorésistance nulle. Longévité supérieure à trois mois. pH optimum : 7,4 (minimum, 5,5 ; maximum, 8,2). Pouvoir réducteur très faible : il ne réduit ni le rouge neutre, ni la safranine ; la phénosafranine est réduite en vingt-quatre heures mais se recolore dans les jours qui suivent, ce qui indique que ce microbe réduit momentanément le bouillon à $rH = 5,8$, mais laisse remonter ensuite le rH au-dessus de cette valeur.

Caractères cultureux. — Les cultures sont légèrement gazo-gènes mais nullement fétides. En gélose profonde, colonies lenti-

(1) et (2) qui nous ont été envoyés par le Dr Vrasse, stomatologiste de l'hôpital Cochin que nous remercions vivement.

(3) qui nous a été envoyé par le Dr Lelong, chef du laboratoire des Enfants-Assistés, que nous remercions vivement.

(4) Des souches semblables avaient été isolées plusieurs fois au laboratoire des anaérobies et n'avaient pas pu être déterminées parce que le diagnostic biochimique des anaérobies n'était pas encore entré dans la pratique courante.

culaires de petite taille, à développement assez lent. En eau peptonée, culture très pauvre ; en bouillon VF glucosé, trouble homogène abondant et gaz. La gélatine n'est pas liquéfiée, le lait n'est ni acidifié, ni coagulé. Les protéines coagulées ne sont pas attaquées. Les glucides suivants sont fermentés : glucose, galactose, lévulose, arabinose et xylose. Les autres ne le sont pas du tout, en particulier le lactose, qui n'est nullement attaqué. Le nitrate de sodium n'est ni réduit, ni attaqué.

Caractères biochimiques. — Il se produit dans les cultures une



Ramibacterium alactolyticum. $\times 2.000$ (Photo Jeantet).

très petite quantité d'indol et des traces d' SH_2 . En bouillon VF glucosé à 1 p. 100 il se produit, après huit jours d'incubation à 37° , 0,0306 g. d' NH_3 et 0,240 g. d'acides volatils, pour 100 c. c. de culture ; il s'agit d'un mélange d'acides acétique et butyrique dans la proportion de 5/1 à 20/1 ; il y a formation d'une quantité très notable d'acide lactique, d'une petite quantité d'amines volatiles et d'aldéhydes, mais ni alcool, ni cétone, ni acétylméthylcarbinol, ni phénol, ni crésol, ni scatol.

Pouvoir pathogène. — Aucune de nos souches ne s'est montrée pathogène pour les animaux de laboratoire. Leur association avec les bactéries isolées en même temps qu'elles dans chacun des cas étudiés n'a pas causé de lésion au cobaye. Les cultures ne contien-

nent ni toxine, ni hémolysine. Ceci ne prouve pas qu'il s'agisse d'une espèce non pathogène, mais simplement qu'il existe une proportion importante de souches apathogènes dans cette espèce.

Caractères sérologiques. — Un lapin a reçu 8 injections intra-veineuses à doses croissantes de corps microbiens vivants jusqu'à concurrence de 25 c. c. Ces injections ont été parfaitement tolérées et ont provoqué l'apparition d'agglutinines dans son sérum qui, huit jours après la dernière injection, agglutinait la souche homologue « AL 3 » au 1/1.000, la souche « FA 4 » au 1/500 et la souche « JD 2 » au 1/100. Le sérum n'agglutinait aucune des souches de *R. ramosum* ni de *R. pseudoramosum* de notre collection, pas plus que le sérum *anti-ramosum*, antérieurement préparé, n'agglutinait nos souches « AL 3 », « FA 4 » et « JD 2 ».

Position dans la systématique. — La morphologie très spéciale de cette espèce permet de la classer très facilement dans le genre *Ramibacterium* proposé (5) pour grouper les espèces *ramosum* (Veillon et Zuber), *pseudoramosum* (Distaso) et *ramosoides* (Runeberg). La physiologie de nos souches les distingue très nettement de ces trois espèces. C'est en effet une bactérie ne faisant pas fermenter le lactose, ne coagulant pas le lait, donnant peu d'indol, et qui est un ferment acéto-butyro-lactique du glucose, alors que : 1° *R. ramosum* est un ferment formo-acétique (6), n'est pas indologène, mais lactolytique et coagulant le lait ; 2° *R. ramosoides* est un ferment acéto-propionique (7) très indologène, lactolytique, coagulant le lait et qui produit de l'éthanol ; 3° *R. pseudoramosum* est un ferment formo-valéro-lactique (8), indologène, lactolytique, coagulant très lentement le lait. Il s'agit donc bien d'une espèce nouvelle nettement autonome et que nous individualisons sous le nom de *Ramibacterium alactolyticum*, étant jusqu'ici la seule des espèces du genre *Ramibacterium* qui ne touche pas le lactose et ne coagule pas le lait.

L'individualisation de cette espèce, reposant à la fois sur des caractères biochimiques et sérologiques, est la première étape de la solution du problème très ancien concernant le pouvoir pathogène des espèces de ce groupe. Veillon et Zuber, dès la découverte de l'espèce *ramosum* avaient isolé des souches très pathogènes tuant les animaux d'expérience. Plus tard, Rist, Hallé et Guillemot avaient pu reproduire expérimentalement des processus gangréneux et putrides avec des souches de *ramosum* associées aux autres microbes des pleurésies purulentes. Cependant des faits contradictoires ont été publiés depuis qui ont remis tout le

(5) A.-R. PRÉVOT, *Manuel de Classification des Anaérobies*, 1 vol., Masson, édit., 1940.

(6) A.-R. PRÉVOT et R. VEILLON, *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **128**, 451.

(7) A.-R. PRÉVOT et R. VEILLON, *C. R. Soc. Biol.*, 1939, **132**, 339.

(8) A.-R. PRÉVOT et R. LOTH, *C. R. Soc. Biol.*, 1941, **135**, 457.

Diagnostic différentiel des 4 espèces de *Ramibacterium*.

	LACTOSE	LAIT	SH ₂	INDOL	ROUGE neutre	TYPE FERMENTAIRE
<i>R. ramosum</i> (Veillon et Zuber) . . .	Energiquement fermenté.	Coagulé en 1 à 3 jours.	0	0	Réduit.	Formo/acétique.
<i>R. ramosoides</i> (Rüneberg)	Fermenté.	Coagulé en 8 jours.	0	+	Réduit.	Acéto/propionique.
<i>R. pseudoramosum</i> (Distaso)	Fermenté faiblement.	Coagulé très lentement (1 m.).	+	+	Réduit.	Formo/valéro/lactique.
<i>R. alactolyticum</i> (Prévot et Taffanel).	Non fermenté.	Non coagulé.	Traces.	Traces.	Non réduit.	Acéto/butyro/lactique.

problème en question : Boez et Holzmänn ; Boez, Kehlstaedt et Schreiber ; Lemierre, Reilly et Bloch-Michel ; Modjallaal ; Lemierre et Reilly ont isolé des souches peu ou pas pathogènes et ont mis en doute ce haut pouvoir pathogène observé par les premiers auteurs. Ces faits ont été résumés dans la thèse de Durnerin (9), et, récemment, Lemierre, Jacquot et Rist (10) ont à nouveau insisté sur le faible pouvoir pathogène de l'espèce « *ramosum* ».

Ces contradictions viennent de ce que les souches étudiées ont toutes été étiquetées sans distinction « *B. ramosus* » alors qu'elles appartiennent vraisemblablement à quatre espèces différentes, dont deux sont très pathogènes : *R. ramosum* et *R. ramosoides* et deux autres beaucoup moins pathogènes : *R. pseudoramosum* et *R. alactolyticum*. Or les substances responsables de ces pouvoirs pathogènes divers et discutés, substances qui ne sont pas antigéniques et tuent par toxémie (11), sont vraisemblablement différentes. On ne pourra le savoir que quand on les aura étudiées en partant de souches rigoureusement déterminées suivant le schéma de classification des espèces du genre *Ramibacterium* antérieurement proposé et complété par la description de cette nouvelle espèce.

(Institut Pasteur. Service des Anaérobies.)

(9) DURNERIN, *Thèse de Médecine*, Paris, 1940, édit. Lefrançois.

(10) LEMIERRE, JACQUOT et RIST, *Bull. Mém. Soc. méd. Hôp. Paris*, 1941, 30-31, 790.

(11) WEINBERG, PRÉVOT, DAVESNE et RENARD, ces *Annales*, 1928, 42, 1167.

UTILISATION D'UNE PRÉPARATION D'AUTOLYSAT DE LEVURE POUR LA CULTURE DE CERTAINES BACTÉRIES

par A. BONNEFOI et A. AUDUREAU.

La formule des milieux de culture usuels comporte une quantité importante de viande et de peptone, normalement d'un prix de revient élevé et qu'en raison des circonstances actuelles il devient impossible, ou tout au moins très difficile, de se procurer. Nous avons été amenés à rechercher un milieu susceptible de remplacer le bouillon peptoné pour la culture du *B. typhi murium*, dont la production en grande quantité a une certaine importance pratique.

Dès ses premières expériences sur les générations spontanées, Pasteur avait choisi l'eau de levure comme un milieu éminemment favorable pour la pullulation des microorganismes. Beijerinck (1), en 1891, a utilisé également de l'extrait de levure pour la culture des bacilles lactiques et des levures. Il a été suivi par de nombreux auteurs et, dès 1902, Thoinot et Masselin (2) ont préconisé l'autolysat de levure comme milieu de culture courant. Ils n'ont cependant pas été suivis.

Vansteenberghe (3), quinze ans plus tard, a étudié la composition chimique de l'autolysat ; s'appuyant sur ces données, Abt et Blanc (4), en 1921, ont montré que de nombreux germes, bacilles du groupe coli-typhique-dysentérique, bactériidie charbonneuse, streptocoques, pyocyaniques, etc..., peuvent se multiplier dans l'autolysat de levure dont le prix de revient est peu élevé. L'autolysat de levure constitue également un excellent milieu pour la multiplication du cilié *Glaucoma piriformis* en culture pure [A. Lwoff, 1932] (5) et pour de nombreuses espèces de Trypanosomides [M. Lwoff, 1933] (6).

Malgré leurs avantages incontestables, les milieux à base de

(1) BEIJERINCK, *Zentralbl. Bakt.*, 1891, **9**, 781.

(2) THOINOT et MASSELIN, *Précis de Microbiologie*. Masson, édit., Paris, 1902.

(3) VANSTEENBERGHE, ces *Annales*, 1917, **31**, 601.

(4) ABT et BLANC. *C. R. Soc. Biol.*, 1921, **84**, 452.

(5) A. LWOFF, *Recherches biochimiques sur la nutrition des protozoaires*. Masson, édit., Paris, 1932.

(6) M. LWOFF, ces *Annales*, 1933, **51**, 55.

levure ne sont pas entrés dans la pratique courante, probablement parce que les microbiologistes ne connaissaient pas de préparations d'autolysat qui puissent remplacer de façon pratique les poudres de peptones. Tous les essais dont nous venons de parler ont été effectués avec des extraits ou des autolysats préparés au laboratoire.

Cependant, il existe un autolysat concentré que l'on peut actuellement trouver dans le commerce et qui donne d'excellents résultats : c'est « l'autolysat de levure Byla », utilisé depuis longtemps dans certains laboratoires pour l'alimentation des animaux d'expérience (souris, drosophiles) et qui se rapproche beaucoup de la « marmite » employée par les microbiologistes anglais.

Cet autolysat est préparé de la manière suivante : de la levure de bière pressée est autolysée en présence d'acétate d'éthyle pendant quatre à cinq jours à la température du laboratoire. Le liquide est filtré, puis concentré dans le vide à basse température. On obtient ainsi une pâte brun foncé renfermant 30 p. 100 d'eau, et dont la conservation est indéfinie. Sa teneur en azote total est de 7,05 p. 100.

L'autolysat peut être utilisé directement pour la fabrication des milieux de culture : on en dissout 5 à 20 g. dans 1 litre d'eau, on ajoute 5 g. de chlorure de sodium et on ajuste au pH voulu. Après chauffage à l'autoclave, le milieu est filtré, réparti et stérilisé.

B. typhi murium se développe dans ce milieu aussi bien qu'en bouillon de viande peptoné. L'autolysat, comme le bouillon peptoné, s'alcalinise de façon notable du fait du métabolisme microbien ; pour éviter cette alcalinisation et aussi pour économiser la levure qui, lorsqu'elle sert à la fois d'aliment azoté et carboné, doit être employée à concentration relativement importante, nous avons ajouté au milieu du glucose et du phosphate de potassium. L'addition de glucose à une concentration de 1 g. p. 1.000 permet de diminuer considérablement la teneur en levure ; mais, en présence de sucre, le milieu passe de pH 7,6 (initial) à pH 5,8, puis remonte à pH 9. Si l'on ajoute à l'autolysat glucosé, renfermant 5 g. d'autolysat et 1 g. de glucose pour 1 litre, 5 g. de phosphate monopotassique et que l'on amène ensuite le pH à 7,6 par addition de soude, le milieu se trouve partiellement tamponné. Il y a une légère acidification au début, le milieu passe à pH 7,05 en seize heures environ, puis remonte progressivement à 8,4 en une huitaine de jours.

Du point de vue de la virulence de *B. typhi murium*, le milieu s'est comporté jusqu'ici comme le bouillon peptoné ordinaire. Au cours de passages en série, pendant deux mois en autolysat et bouillon peptoné, la virulence des souches entretenues dans les deux milieux a suivi une évolution parallèle.

Nous n'avons pas étudié systématiquement la valeur de l'auto-

lysats. Nous pouvons indiquer cependant que les staphylocoques et les streptocoques s'y développent ; il y a avantage pour ceux-ci à utiliser un milieu renfermant 20 p. 1.000 d'extrait.

On peut en tout cas envisager dès maintenant l'utilisation de l'autolysat de levure comme milieu de base pour de nombreux microbes qu'il s'agit d'enrichir selon les besoins particuliers de certaines bactéries, par de l'ascite, du sang, etc... L'autolysat de levure peut donc remplacer le bouillon de viande peptoné pour la culture de certains germes et constituer la base d'un milieu à prix de revient très bas.

(Institut Pasteur, Service des Vaccins
et Service de Physiologie microbienne.)

ÉVALUATION PAR IRRADIATION α DE LA TAILLE DES ULTRA-VIRUS

par P. BONÉT-MAURY.

Trois méthodes nous ont fourni le principal de nos connaissances sur les dimensions des ultra-virus : l'ultra-filtration, l'ultra-centrifugation et la micrographie en U. V. Récemment nos moyens d'investigation se sont enrichis de deux procédés nouveaux : l'irradiation et la micrographie électronique.

La méthode d'irradiation a été proposée en 1938 par Holweck (1) sous le nom d'ultra-micrométrie statistique pour mesurer les dimensions élémentaires des protéines-virus et des grosses molécules. Le principe est simple : irradier un virus, c'est tirer sur une cible et on l'atteindra d'autant plus fréquemment qu'elle sera plus grande. Les petits virus seront inactivés, par un même rayonnement, beaucoup plus lentement et difficilement que les gros. La théorie statistique des actions radiobiologiques permet de traduire mathématiquement ces notions et de calculer de façon précise la cible ou section efficace. La plupart des travaux de radiobiologie sont effectués avec des rayons X. Des raisons théoriques et pratiques nous ont fait préférer les rayons α et nous avons utilisé pour l'irradiation des ultra-virus une technique qui nous avait déjà servi en 1937, avec H.-R. Olivier, pour atténuer les germes pathogènes, notamment le bacille de Koch. On obtient

(1) HOLWECK, C. R. Acad. Sci., 1938, 207, 653.

commodément par ce procédé des doses élevées de rayonnement qui nécessiteraient en rayons X un appareillage spécial de grande puissance.

Nous utilisons comme source de rayonnement α le radon enfermé sous basse pression (2, 3 cm. de Hg) dans des ampoules spéciales, munies d'une pointe capillaire. L'extrémité du capillaire est brisée dans la suspension virulente et le virus, aspiré par la différence de pression, vient remplir l'ampoule. Celle-ci est scellée et l'irradiation se poursuit pendant le temps choisi, généralement à la glacière. Les méthodes classiques de la radioactivité permettent une mesure précise de la quantité totale de radon contenue dans l'ampoule ; la pesée de celle-ci, avant et après remplissage, donne le volume total de suspension irradiée. On en déduit pour chaque irradiation la quantité de radon désintégré par centimètre cube, dose usuellement exprimée en millimicrocuries détruites par centimètre cube ou $\mu\text{cd}/\text{c.c.}$

Préparation et titrage de la suspension de virus. — Les suspensions virulentes d'herpès ou de vaccine sont obtenues par broyage au mortier, dans dix fois son poids de sérum physiologique, d'un cerveau de lapin infecté. L'émulsion est centrifugée rapidement et ultra-filtrée sur une membrane de 1 μ . De cette façon, les corpuscules de virus restent enrobés dans une mince pellicule de matière cérébrale qui les protège contre toute action toxique (2) du milieu suspenseur irradié, mais dont l'épaisseur, négligeable devant le parcours des rayons α , ne peut constituer un obstacle pour leur pénétration.

Pour établir la courbe d'inactivation nécessaire pour le calcul des dimensions, il faut connaître, pour chaque dose, le titre de la suspension avant et après irradiation. Les méthodes classiques de titrage nous ont paru trop peu précises et nous leur avons substitué des méthodes statistiques qui permettent d'obtenir une précision mieux en rapport avec celle réalisée sur la partie physique de l'expérience (moins de 5 p. 100 sur la mesure de la dose).

a) *Virus herpétique* : La méthode employée, déjà décrite ailleurs (3) est analogue à celle utilisée en pharmacodynamie pour le titrage biologique de certains médicaments ; elle est connue sous le nom de méthode de Dragsted Lang ou des accumulations. On détermine le pourcentage de mortalité de lots de souris injectées avec des dilutions décroissantes de la suspension virulente et on calcule la dilution qui amène une mortalité de 50 p. 100 ; cette dilution est choisie comme titre du virus. Nous avons utilisé parallèlement une deuxième méthode statistique fondée sur une corrélation entre la dilution et la *vie moyenne* des souris injectées.

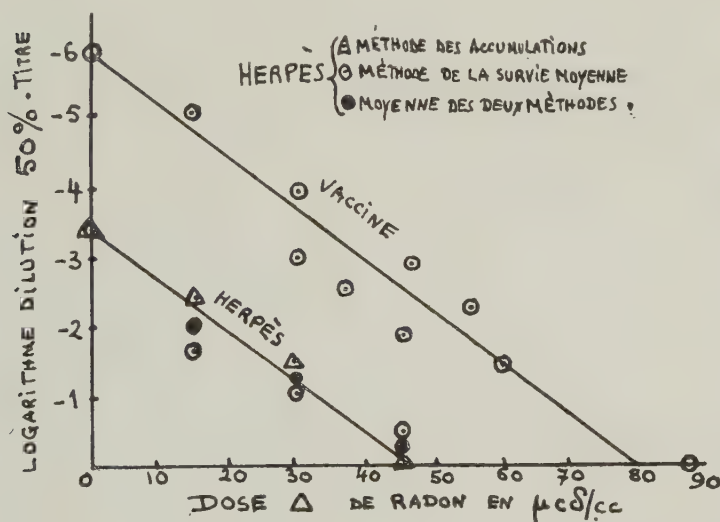
(2) BONÉT-MAURY, *C. R. Soc. Biol.*, 1941, **85**, 1117.

(3) BONÉT-MAURY, *C. R. Soc. Biol.*, 1941, **85**, 385.

tées avec cette dilution. La vie moyenne croît avec l'affaiblissement de la virulence et varie sensiblement comme l'inverse du logarithme de la dilution (pD des auteurs américains). Les deux méthodes nous ont donné des résultats concordants.

b) *Virus vaccinal* : Parker et Rivers ont décrit une méthode statistique très analogue à celle de Dragstedt-Lang, l'inoculation dermique positive remplaçant l'infection mortelle. Nous avons utilisé ce procédé pour le titrage du virus vaccinal et parallèlement une deuxième méthode fondée sur une corrélation entre la surface de la pulpe au sixième jour et la dilution virulente correspondante. Un facteur correctif fait intervenir le temps d'incubation de la papule. Les résultats des deux méthodes sont très voisins.

Courbe d'inactivation. Calcul de la cible. — La figure 1 résume



l'ensemble des résultats obtenus avec les deux virus. Les coordonnées sont demi-logarithmiques, les ordonnées représentant les logarithmes de l'inverse de la dilution 50 p. 100 représentant le titre après irradiation. On remarque que les points expérimentaux se groupent sur deux droites parallèles.

L'inactivation des deux virus obéit donc à la même loi, c'est-à-dire qu'ils présentent au rayonnement des cibles identiques ou, en d'autres termes, qu'ils ont même surface efficace. Le diamètre de celle-ci se calcule, pour le rayonnement α du radon, par la formule suivante :

$$d = \frac{980}{\sqrt{\Delta 10}} \text{ m}\mu.$$

$\Delta 10$ représente, en μcd la dose de radon nécessaire pour réduire de $1/10$ l'activité de la suspension virulente. On trouve, pour les deux virus,

$$d = 260 \text{ m}\mu.$$

Cette valeur doit subir une correction car la particule α donne un dense cylindre d'ionisation de rayon r et son action peut donc s'exercer à une distance r de sa trajectoire. D'après Iaffé, qui a étudié très complètement l'ionisation α , $r = 20 \text{ m}\mu$. Dans ces conditions, la section efficace corrigée aurait pour diamètre :

$$d = 220 \text{ m}\mu.$$

Une certaine incertitude subsiste sur la valeur de r et des travaux postérieurs à ceux de Iaffé conduisent à des valeurs plus faibles ou même négligeables. D'autre part, notre calcul suppose que le rayonnement α du radon est seul en cause, comme on l'admet généralement en considérant qu'il représente 86 p. 100 de l'énergie rayonnée. Une action possible des rayons β , qui ne peut être discutée ici, ne paraît pas cependant complètement exclue ; elle doit être faible et elle aurait pour effet de diminuer le diamètre corrigé.

Signification de la section efficace. — La surface efficace est la surface offerte au rayonnement par les unités virulentes ; elle est mesurée par le diamètre du cercle de surface équivalente, en dehors de toute hypothèse sur sa forme réelle. La radiobiologie statistique montre que ce diamètre peut être très inférieur aux dimensions réelles d'un organisme possédant une structure.

Holweck et Lacassagne ont montré que cette surface s'identifiait souvent avec celle de certains organites des cellules irradiées. La méthode fournit donc, non le contour extérieur du virus, mais un *diamètre biologique*. Il est important de le comparer avec le diamètre réel du virus donné par d'autres méthodes.

Comparaison avec le résultat des autres méthodes. — Nous avons rassemblé dans le tableau I les données relatives à la taille du virus vaccinal, qui paraît être un des mieux connus à l'heure actuelle.

Les dimensions, pour la micrographie électronique, ont été déterminées sur deux clichés originaux de H. Ruska, clichés mis à notre disposition par M. C. Levaditi.

Une discussion très complète des résultats des différentes méthodes nous a conduit à écarter, comme peu sûres et statistiquement mal définies, les données de l'ultrafiltration et de la micrographie en U. V. Pour l'ultrafiltration une critique très complète a été faite par M. Lecomte du Noüy dans l'ouvrage sur les Ultra-Virus de C. Levaditi et P. Lépine ; M. Levaditi, récemment, a

TABLEAU I. — Dimensions du virus vaccinal en μ .

MÉTHODE	DIMENSION MESURÉE	VALEURS		AUTEURS	OBSERVATIONS
		moyenne	extrême		
Ultra-filtration.	Diamètre moyen des pores du filtre.	450 450	125-175 140-160	(4) (5)	Dimension des plus petits corpuscules
Micrographie en ultraviolet.	Largeur des plus petits corpuscules.	465	460-470	(6)	
Micrographie électronique. .	Longueur moyenne.	290			
	Largeur moyenne.	230			
	Diamètre du cercle de même surface.	260	235-285	(7)	
		$\sigma = 21$			
Irradiation.	Diamètre du cercle équivalent à la section efficace.	220		(8)	Rayons γ . Rayons X.
		80		(9)	
Centrifugation	Diamètre de la sphère équivalente.	220	210-230	(10)	Densité : 1,10. 1,10. 1,16. 1,16. 1,18. 1,25. 1,30.
		(250)		(11)	
		200		(10)	
		244	236-252	(13)	
		175	170-180	(14)	
		170	99-240	(15)	
		179		(11)	

(4) ELDFORD et ANDREWES, *Brit. J. Exp. Path.*, 1931, **13**, 36.(5) LEVADITI, PAIC et KRASSNOFF, *C. R. Soc. Biol.*, 1930, **132**, 526.(6) BARNARD, *J. Royal Micr. Soc.*, 1932, **52**, 23.

(7) BONÉT-MAURY. Non publié.

(8) BONÉT-MAURY et PÉRAULT, *C. R. Soc. Biol.*, 1941, **135**, 1117.(9) HOLWECK, *C. R. Ac. Sc.*, 1938, **207**, 380.(10) BECHHOLD et SCHLESINGER, *Bioch. Zschr.*, 1931, **216**, 387.(11) P. LÉPINE, J. LEVADITI et GIUNTINI, *Ann. Inst. Pasteur*, 1941, **67**, 477.(13) PICKELS et SMADEL, *J. exp. Med.*, 1938, **68**, 583.(14) ELDFORD et ANDREWES, *Brit. J. exp. Pathol.*, 1937, **18**, 162.(15) MAC INTOSH et SELBIE, *Brit. J. exp. Pathol.*, 1937, **18**, 162.

insisté encore sur d'autres causes d'erreur (16). Même en considérant le filtre comme un tamis idéal, sans adsorption ni colmatage, percé de pores égaux, le diamètre déterminé ne pourrait correspondre à une valeur statistique bien définie. En ce qui concerne la micrographie en U. V., les phénomènes de diffraction ont une telle importance dans le domaine des longueurs d'onde utilisées (275 μ) que l'on ne peut déduire des dimensions de l'image celles de l'objet diffractant ; l'observation photographique complique encore le problème, car le diamètre de l'image varie avec le temps de pose.

Le tableau montre que la micrographie électronique et l'ultra-

(16) C. LEVADITI, *C. R. Soc. Biol.*, 1941, **135**, 1322.

centrifugation donnent des résultats concordants, à condition de choisir comme densité du virus la valeur 1,16 qui nous paraît la plus probable d'après le travail de Pickels et Smadel (13). Nous avons recalculé, avec cette valeur, les résultats récents de MM. Lépine, J. Levaditi et Giuntini (11) et le diamètre trouvé est en très bon accord avec les données de la micrographie électronique.

Conclusion. — Si l'on écarte pour les raisons données les résultats de l'ultra-filtration et de la centrifugation, les dimensions extérieures les plus probables du virus vaccinal seraient de l'ordre de 250 $m\mu$, c'est-à-dire notablement supérieures aux valeurs classiquement admises : 125-175 $m\mu$. L'erreur sur ce diamètre ne peut être fixée exactement mais elle ne paraît pas dépasser beaucoup 15 p. 100. D'après les clichés électroniques, la dispersion est faible autour de cette valeur et la déviation standard est inférieure à 10 p. 100.

Les données de l'irradiation α qui atteignent le diamètre radiosensible de l'unité infectieuse conduisent à des valeurs du même ordre, la différence observée pouvant être raisonnablement attribuée à l'incertitude sur les corrections à faire subir au diamètre brut. On arrive ainsi à l'idée d'une coïncidence entre la section efficace d'irradiation et le contour réel de l'unité infectieuse, c'est-à-dire à une radiosensibilité totale de celle-ci. Ceci confirmerait l'absence de structure traduite par les images électroniques et serait un argument en faveur de la conception macro-moléculaire des gros virus.

(Travail effectué, pour la partie biologique au *Laboratoire de M. Levaditi, Institut Fournier*, avec le concours de A. Vaisman et R. Péraut, et pour la partie physique au *Laboratoire Curie de l'Institut du Radium*.)

Dans la discussion qui suit cette communication, M. Grabar explique que, les membranes d'ultrafiltration n'étant pas isoporeuses, les pores ont des formes et des parcours irréguliers et que le rapport entre les dimensions des particules et le diamètre moyen des pores d'une membrane (qui n'est qu'un nombre relatif) varie suivant la porosité des membranes. Mais la détermination des dimensions d'une particule d'après les résultats d'expériences d'ultrafiltration se fait en appliquant des facteurs de correction établis empiriquement. Ces facteurs comprennent par conséquent les erreurs résultant de l'imperfection des membranes. Les résultats concordants obtenus dans de très nombreux cas entre l'ultrafiltration et l'ultracentrifugation font penser que les facteurs de correction sont assez exacts. Il faut remarquer, en outre, que les résultats de l'ultrafiltration donnent la dimension des éléments les plus petits.

On rappelle d'autre part que l'irradiation par les rayons α avait déjà été employée comme moyen de détermination de la taille d'agents infravisibles (bactériophages) dont le titre peut être déterminé avec une grande précision, par F. Holweck, S. Luria et E. Wollman (*C. R. Ac. Sc.*, 1940, **210**, 639) qui ont obtenu par cette nouvelle méthode une valeur de la taille d'un bactériophage coli-dysentérique concordant avec celles fournies par l'ultrafiltration et l'ultracentrifugation. Les valeurs obtenues par M. Bonét-Maury sont par contre très supérieures à celles fournies par les autres techniques. Ces valeurs (260 m μ) placeraient du reste les virus de la vaccine et de l'herpès parmi les agents visibles au microscope ordinaire en lumière de courte longueur d'onde.

Enfin, M. Lépine observe que si les images hypermicroscopiques sont relativement dépourvues d'aberration chromatique (emploi d'électrons monocinétiques) elles présentent par contre une forte aberration de sphéricité dont il faut peut-être tenir compte lorsqu'on se livre à des mesures sur cliché.

**ACTION PATHOGÈNE POUR LE COBAYE
DE QUELQUES CULTURES
DE BACILLES TUBERCULEUX BOVINS
AU COURS DE PASSAGES SUCCESSIFS
SUR POMME DE TERRE BILIÉE.
IMPORTANCE DE LA VOIE D'INOCULATION**

Par F. VAN DEINSE.

Dans un Mémoire antérieur (1) nous avons attiré l'attention sur le caractère spécial que prennent certaines souches de bacilles tuberculeux du type bovin, entretenues depuis quelques années sur pomme de terre biliée. Nous avons montré comment telle culture biliée, inoculée par voie sous-cutanée au cobaye, n'est plus capable de tuberculiser cet animal, alors que le lapin, injecté avec la même culture par voie veineuse, meurt rapidement d'une toxi-infection du type « Yersin ». Nous avons fait remarquer que les tuberculoses « Yersin », qu'on obtient en inoculant au lapin ces cultures bovines biliées, ressemblent à celles causées par une

(1) F. VAN DEINSE, ces *Annales*, 1941, **66**, 191.

injection intraveineuse de bacilles tuberculeux aviaires : absence de granulations aux poumons dans les deux tiers des cas, caractère toxique banal des lésions histologiques.

Continuant l'étude de ces souches bovines, réensemencées autrefois tous les quatorze jours, maintenant toutes les trois semaines sur pomme de terre biliée, nous les avons injectées par voie sous-cutanée et par voie sanguine à des cobayes. Nous voudrions donner ici un exposé sommaire de ce que ces inoculations nous ont appris au sujet de ces cultures, entre le cinquantième et le centième passage sur bile.

Comme nous venons de le dire, les cultures biliées en question, très virulentes pour le cobaye avant leur passage sur bile, sont devenues incapables, dans la presque totalité des cas, de tuberculiser le cobaye, quand on les introduit par la voie sous-cutanée, même à la dose de 2 mg. Des survies de plus d'un an, avec, à l'autopsie, absence totale de lésions spécifiques, sont courantes. Il en va tout autrement quand on injecte ces mêmes cultures par la voie veineuse ou cardiaque. On assiste alors à des morts relativement rapides, surtout quand on emprunte la voie cardiaque (survie moyenne d'une trentaine de jours). A l'autopsie de ces cobayes, on est frappé par l'uniformité du tableau : grosse rate, poumons, foie et surrénales congestionnés. Le foie est quelquefois couvert d'un réseau de fines taches jaunâtres, comme on les voit à la suite d'une injection intraveineuse de bacilles aviaires. Mais le fait saillant de ces observations, c'est l'absence constante de granulations sur les poumons. A l'examen histologique des poumons de ces cobayes, morts à la suite d'une injection intracardiaque ou intraveineuse de bacilles bovins biliés, appartenant aux passages que nous avons utilisés, on ne voit, le plus souvent, qu'une infiltration diffuse, histio-leucocytaire plus ou moins accentuée des parois alvéolaires, de la congestion, de l'œdème des alvéoles, mais les formations nodulaires typiques font le plus souvent défaut, ou, quand on en trouve, elles sont rares et se tiennent tout à fait à l'arrière-plan du tableau. *On ne trouve généralement pas de bacilles.*

Voici maintenant, à titre de comparaison, un résumé des observations que nous avons pu faire, il y a quelques années, avec R. Schwartz, concernant l'infection aviaire ou bovine du cobaye par voie cardiaque (2). Les cobayes, ayant reçu une dose de 2 mg. de bacilles aviaires par voie cardiaque, meurent après une survie moyenne de vingt-quatre jours ; autopsie : hypertrophie souvent importante de la rate, congestion du foie, des poumons et des surrénales, aucune granulation visible ; histologie des poumons : plages de congestion, quelquefois œdème hémorragique, quelques

(2) F. VAN DEINSE et R. SCHWARTZ, *C. R. Soc. Biol.*, 1937, **125**, 693.

rare nodule épithélioïdes, *bacilles nombreux*. Les cobayes, infectés par voie cardiaque avec 2 mg. de bacilles bovins très virulents (souche bovine XIV), meurent après une survie moyenne de onze jours ; autopsie : hypertrophie plus ou moins importante de la rate, congestion très accentuée du foie et des surrénales, poumons couverts de pétéchies ou de petites granulations grises ; histologie des poumons : plages épithélioïdes ou nodules histioleucocytaires disséminés, souvent œdème hémorragique, *bacilles très nombreux*. On voit que l'injection, par la voie sanguine, d'une forte dose (1 à 2 mg.) de nos bacilles bovins biliés, tout en étant suivie, chez le cobaye, d'une infection mortelle, provoque des lésions qui se rapprochent de celles qu'on trouve chez cet animal après une injection cardiaque d'une dose analogue de bacilles aviaires. Il en est de même en ce qui concerne la survie des animaux : trente jours en moyenne au lieu de onze pour un bacille bovin très virulent (vingt-quatre pour un bacille aviaire). Mais, contrairement à ce qui se passe pour le bacille aviaire et pour le bacille bovin virulent, les bacilles sont absents ou très rares dans les lésions pulmonaires. Il semble que les bacilles tuberculeux bovins, après un certain nombre de passages successifs sur pomme de terre biliée, nombre qui, d'après nos expériences, varie avec les souches, voient diminuer leur aptitude à se multiplier sur place dans l'organisme. Au lieu des lésions nodulaires si caractéristiques pour la tuberculose virulente, on voit, dans les poumons des cobayes inoculés par voie sanguine, des lésions diffuses, donnant l'impression d'être causées par un poison diffusible, et ressemblant aux lésions dues au bacille aviaire. [Nous avons insisté à plusieurs reprises sur le caractère toxique de ces dernières (3).] Des expériences de contrôle nous ont montré que ce caractère toxique n'est pas lié au milieu bilié sur lequel ces souches sont entretenues ; en effet, quand on les réensemence sur pomme de terre glycinée ordinaire, les cultures en question, tout en poussant sous forme de colonies sèches et rugueuses, gardent ce caractère spécial. D'autre part, nous possédons d'autres cultures biliées, qui, même injectées par voie cardiaque à la dose de 2 mg. ne parviennent plus à tuer le cobaye. Il en est de même pour le BCG, qui, lui aussi, peut être inoculé au cobaye par voie cardiaque à la dose de 2 mg. sans dommage pour l'animal.

(Institut Pasteur.

Laboratoires de recherches sur la tuberculose.)

(3) F. VAN DEINSE, R. SCHWARTZ et J. SOLOMIDÈS, ces *Annales*, 1939: 63, 443.

ÉTUDE DE LA DISPERSION DU BACILLE DE LA FLÉOLE DANS L'ORGANISME DE LA SOURIS

par J. LAFON.

L'étude de la tuberculose expérimentale de la souris a montré que si l'inoculation sous-cutanée donne des résultats inconstants, les voies péritonéale et veineuse, et surtout intracranienne, permettent d'obtenir, à coup sûr, des infections sévères avec des doses assez faibles de bacilles.

Partant de ces données, nous avons étudié par la culture des organes la dispersion du bacille de la fléole inoculé par voie sous-cutanée et par voie intracranienne chez des souris neuves et chez des souris préparées par une injection antérieure de ces mêmes bacilles.

a) *Voie sous-cutanée.* — Des souris âgées de six semaines à deux mois reçoivent, sous la peau du flanc droit, 1 mg. de culture, âgée de quatre à six jours, de bacilles de la fléole, en suspension dans 0,5 c. c. d'eau physiologique. Les souris sont sacrifiées après des délais variant de huit heures à cinquante-six jours. L'expérience nous ayant montré que nos souches résistaient fort mal aux traitements antiseptiques du genre de ceux employés pour les produits tuberculeux, nous avons opéré comme il suit :

L'animal étant épinglé sur une plaque de liège est flambé au Bunsen, l'autopsie est menée rapidement. Un jeu différent d'instruments est prévu pour chacun des temps suivants : ouverture et étalement de la peau ; ablation du ganglion axillaire droit ; ouverture, après flambage, de la paroi abdominale et étalement du péritoine ; ablation de la rate ; ablation du rein gauche. Chaque organe prélevé est déposé dans un mortier stérile, broyé avec du sable stérile et mis en suspension dans 2 c. c. d'eau physiologique stérile. Cette suspension est ensuiteensemencée directement sur des milieux à l'œuf, à raison de 0,2 c. c. par tube et 4 tubes par organe. Après quatre et six jours d'étuve à 37°5, on compte les colonies sur les 4 tubes et on en fait la moyenne (tableau I).

Donc dissémination dès les premières heures, puis en quantités croissantes jusque vers le cinquième ou sixième jour, date à partir de laquelle on ne trouve plus de bacilles que dans le ganglion régional. Ils disparaissent de ce ganglion entre le treizième et le trentième jour.

b) *Voie intracranienne.* — La dose de bacilles à injecter est

Nombre moyen de colonies.

	ANIMAUX SACRIFIÉS APRÈS :								
	8 h.	24 h.	72 h.	4 jours	6 j.	13 j.	26 j.	31 j.	56 j.
Rate	4	50	24	∞	0	0	0	0	0
Rein.	5	0	6	Quelques-unes.	0	0	0	0	0
Ganglion axillaire . . .					∞	6		0	0

mise en suspension dans 1/20 de centimètre cube d'eau physiologique. Les doses de 1 mg. et au-dessus amènent très rapidement la mort de l'animal. Avec 1/10 de milligramme, le nombre des bacilles contenus dans le cerveau est tel qu'on ne peut dénombrer les colonies qu'en augmentant la dilution des suspensions d'organes (tableaux II et III).

Résultats avec 1/10^e de milligramme.**Nombre moyen de colonies.**

	ANIMAUX SACRIFIÉS APRÈS :					
	24 heures	48 heures	4 jours	6 jours	14 jours	31 jours
Cerveau	∞	∞	∞	∞	∞	6
Rate.	50	> 100	100		60	6
Rein.	50	20	0		0	

Résultats avec 1/50^e de milligramme.

	ANIMAUX SACRIFIÉS APRÈS :						
	8 heures	24 heures	72 heures	6 jours	13 jours	26 jours	56 jours
Cerveau	∞	∞	∞	2 (1)	30	5	0
Rate	22	150	100	2 (1)	100	0	0
Rein.	8	12	3	0	10	0	

(1) Tubes très souillés.

L'injection intracrânienne provoque donc une dispersion beaucoup plus importante et plus durable que l'injection sous-cutanée.

c) *Dispersion des bacilles injectés par voie crânienne à des animaux préparés par une inoculation sous-cutanée.* — Des souris ont été préparées par une injection sous-cutanée de 1 mg. de

bacilles de la fléole ; quarante-cinq jours après, quand leur organisme ne contient plus de bacilles décelables par la culture des organes, elles reçoivent par voie crânienne 1/50 de milligramme des mêmes bacilles. Puis elles sont sacrifiées et autopsiées comme précédemment (tableau IV).

Nombre moyen de colonies.

	ANIMAUX SACRIFIÉS APRÈS :					
	8 heures	24 heures	72 heures	6 jours	13 jours	26 jours
Cerveau	∞	∞	200	30	4	0
Rate	110	70 à 80 (1)	200	1	8	6
Rein	8	20	3	0	0	

Tube très contaminé.

La différence avec les souris non préparées étant peu importante, on peut conclure que si le bacille de la fléole modifie la réceptivité des souris à l'égard des germes homologues, cette modification disparaît lorsque les bacilles de la primo-infection sont éliminés.

Conclusions. — 1° Les bacilles de la fléole injectés à la souris par voie sous-cutanée ou intracrânienne se dispersent dans les organes sans y créer de lésions macroscopiques ;

2° La dispersion est nettement plus importante et plus durable quand les bacilles ont été inoculés par voie intracrânienne que lorsqu'ils ont été inoculés sous la peau ;

3° Chez la souris le bacille de la fléole ne semble pas avoir de propriétés vaccinales à l'égard des germes homologues.

(Institut Pasteur.

Laboratoires de recherches sur la tuberculose.)

**MODIFICATIONS ANATOMO-PATHOLOGIQUES
PROVOQUÉES PAR LE BCG
AU NIVEAU DES SCARIFICATIONS CUTANÉES**

Travail communiqué au Congrès par J. BRETEY.
(Ce travail paraîtra sous forme de *Mémoire* dans les *Annales de l'Institut Pasteur*.)

NOTES DE LABORATOIRE

**EMPLOI PRATIQUE DE L'ÉLECTRODE DE VERRE
POUR LA MESURE DU pH**

par J. LOISELEUR.

(Paraîtra sous forme de *Mémoire* dans les *Annales de l'Institut Pasteur*.)

ERRATA

Séance du 6 novembre 1941.

(Ces *Annales*, 67).

Communication R. DESCHIENS

Page 468, deuxième et troisième ligne :

Au lieu de : *Entamoeba dysenteria*.

Lire : *Entamoeba dysenteriae*.

Page 469, troisième ligne :

Au lieu de : Il convient de noter qu'en 1936 et 1939.

Lire : Il convient de noter qu'entre 1936 et 1939.

PROCHAINES SEANCES

Jeudi 5 mars 1942.

En raison de la Semaine Sainte, la séance d'avril aura lieu le jeudi 9 avril 1942.

Jeudi 7 mai 1942.

Les séances ont lieu à 16 heures, au Grand Amphithéâtre de l'Institut Pasteur.

Les membres désirant présenter des communications sont priés d'en aviser le Secrétaire général, et de lui en communiquer le titre, pour permettre l'établissement de l'ordre du jour de la réunion.

Le Secrétaire général :

P. LÉPINE.

Le Gérant : G. MASSON.

Imprimé par l'Anc^{ne} Imple de la Cour d'Appel, A. MARETHEUX, Dir.,
1, r. Cassette, à Paris (France)